

Hipericum triquetrifolium Turra Bitkisinin Sıçanlarda Kemoterapi Nedenli Testiküler
Toksisiteye Karşı Koruyucu Etkisi

Senanur Can

DOKTORA TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Eylül 2018

Protective Effect of *Hipericum triquetrifolium* Turra Against Chemotherapy Induced
testiculer toxicity in Rat

Senanur Can

DOCTORAL DISSERTATION

Department of Biology

Sep 2018

Hipericum triquetrifolium Turra Bitkisinin Sıçanlarda Kemoterapi Nedenli Testiküler
Toksisiteye Karşı Koruyucu Etkisi

Senanur Can

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Genel Biyoloji Bilim Dalında
DOKTORA TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Prof. Dr. Adnan AYHANCI

Eylül 2018

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Senanur Can'ın DOKTORA tezi olarak hazırladığı “*Hipericum triquetrifolium* Turra Bitkisinin Sıçanlarda Kemoterapi Nedenli Testiküler Toksikiteye Karşı Koruyucu Etkisi” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oybirliği ile kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Adnan Ayhancı

İkinci Danışman: --

Doktora Tez Savunma Jürisi:

Üye: Prof. Dr. Adnan Ayhancı

Üye: Prof.Dr. Varol Şahintürk

Üye: Prof. Dr. H.Mehtap Kutlu

Üye: Doç. Dr. Dr.Figen Çalışkan

Üye: Doç. Dr. Gökhan Kuş

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hürriyet ERŞAHAN

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Prof. Dr. Adnan AYHANCI danışmanlığında hazırlamış olduğum “*Hipericum triquetrifolium* Turra Bitkisinin Sıçanlarda Kemoterapi Nedenli Testiküler Toksikiteye Karşı Koruyucu Etkisi” başlıklı DOKTORA tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim.

Tez kapsamında yürütülen tüm deney hayvanı çalışmaları için ESOGÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEEK)’nin 531-2/2016 protokol numaralı izni alınmış ‘Deney Hayvanları Etik Kurulu Yönergesi’ ve ‘Hayvan Hakları Evrensel Bildirgesi’nde yer alan tüm şartlara uyulmuştur. 21/09/2018

Senanur CAN

İmza

ÖZET

Kemoterapide, siklofosfamid (CP) gibi yüksek doz alkilleyici ajanlar, çoklu organ toksisitesine neden olmaktadır. Testiküler hasar da yaygın olarak görülmesine rağmen, antikanser ilaçların bu yan etkisi diğer yan etkilere göre daha az araştırılmıştır. Bizim çalışmamızda da sıklıkla kullanılan bir antikanser ilaç olan CP' nin testiküler toksisiteye karşı, *Hipericum triquetrifolium* Turra (HT, Kantaron) bitki ekstresinin hücre koruyucu etkisi araştırıldı. Bu amaçla Wistar cinsi sağlıklı, 3-4 aylık, 200±20 g, erkek albino sıçanlar her grupta 7 hayvan olacak şekilde 9 gruba ayrıldı (kontrol/ 150 mg/kg CP/ 25, 50, 100 µg/ml HT grupları/ CP+25, 50, 100 µg/dl HT grupları ve 0.2 ml DMSO). Tüm enjeksiyonlar intraperitoneal olarak yapıldı. CP hariç diğer kimyasallar 6 gün boyunca her gün verildi. CP' li gruplarda, CP, 6. gün tek doz olarak verildi ve 7. gün ketamin/ksilazin anestezisi altında kan ve doku örnekleri alınarak hayvanlar öldürüldü. Alınan örnekler biyokimyasal, histopatolojik, immünohistokimyasal (kaspaz 3, Bcl-2, Bax) ve Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop (LTKM) ile incelendi. HT 'nin antioksidan etkilerini saptamak için biyokimyasal parametrelerden malondialdehid (MDA), glutatyon (GSH), süperoksitdismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), toplam antioksidan seviye (TAS), toplam oksidan seviye (TOS), oksidatif stres indeksi (OSİ) düzeylerine bakıldı. CP verilen gruplarda MDA ve TOS 'nin artması ile GSH ve TAS'nin azalması CP nedenli oksidatif hasarı gösterdi. Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal olarak dokuların boyanması, CP nedenli testiküler hasarı açık bir şekilde gösterdi. Deneysel sonuçlarımız, sıçanlarda HT'nin metanol ekstresinin 100 mg/kg'lık dozunun diğer dozlarına göre daha etkili ve CP'ye karşı koruyucu olduğunu göstermektedir. Bu çalışma ESOGÜ /HADYEK izni ile yapılmıştır (No: 531-2/2016).

Anahtar Kelimeler: Siklofosfamid, Testiküler toksisite, *Hipericum triquetrifolium* Turra ekstresi, Antioksidan, Sıçan

SUMMARY

High-dose alkylating agents such as cyclophosphamide (CP) in chemotherapy cause multiple organ toxicity. Although testicular injury is also common, this side effect of anticancer drugs has been less studied than other side effects. Therefore, the cell protective effect of *Hypericum triquetrifolium* Turra (HT) extract against testicular toxicity was investigated. With this in mind, healthy male albino Wistar rats, aged 3-4 months weighing 200 ± 20 g, were divided into 9 groups, each of them containing 7 members (Control, 150 mg/kg CP/ 25, 50, 100 μ g/ml HT Groups, CP+25, 50, 100 μ g/dl HT Groups and 0.2 ml DMSO). All the injections were applied intraperitoneally. Except for CP, all the other chemicals were given for 6 consecutive days. In the CP groups, the drug was given only one dose a day. On the 7th day, the rats were sacrificed under ketamine/xylazine anaesthesia before their blood and tissue samples could be taken for analysis. The samples were then analysed biochemically, histopathologically and immunohistochemically (caspase 3, Bcl-2, Bax). In order to determine the effects of antioxidant properties of HT, MDA, GSH, SOD, CAT, TAL, TOL and OSI were analysed. In the CP group, decreased GSH and TAS with increase in MDA and TOS showed oxidative damage caused by CP. Caspase 3, Bcl-2, Bax immunoactivities showed CP-related testicular damage depending on the severity of coloration. Our experimental results show that the methanol extract of HT is more effective and protective against CP than other doses of 100 mg/kg in rats. This study was conducted with ESOGÜ/HADYEK.(No: 531-2/2016).

Keywords. Cyclophosphamide, Testicular toxicity, *Hypericum triquetrifolium* Turra extract, Antioxidant, Rats.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimin planlanmasında ve yürütülmesinde bana danışmanlık eden, beni yönlendiren; tecrübe ve hoşgörülerinden yararlandığım Sayın Hocam Prof. Dr. Adnan AYHANCI' ya saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tez İzleme Sunumlarım sırasında teknik bilgi ve tecrübeleri ile desteklerini esirgemeyen Tez İzleme Kurulu Üyelerimiz Sayın Prof. Dr. H.Mehtap KUTLU ve Doç.Dr. Figen ÇALIŞKAN 'a teşekkürü bir borç bilirim. Çalışmalarım süresince bana fikirleri ve deneyimleriyle destek olan, vakit ayıran Sayın Prof. Dr. Varol ŞAHİNTÜRK'e saygı ve şükranlarımı sunarım. Tez çalışmamın istatistiksel işlemlerinde yardımlarını esirgemeyen Arş.Gör.Dr. Ahmet MUSMUL'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez araştırmalarımın laboratuvar deneyleri aşamasında samimi destekleriyle gösterdikleri sabır ve yardımdan dolayı Dr. Öğr. Üyesi Songül Çetik, Dr. Öğr. Üyesi, Cumali Keskin, Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Cengiz ve Doktora öğrencisi Özgün Teksoy'a çok teşekkür ederim. Ve bu çalışmada emeği geçen herkese teşekkür ederim.

Doktora eğitimim boyunca çeşitli aşamalarda zorlukları aşmamda desteklerini esirgemeyip eğitime verdikleri önemden dolayı Özel Yesevi Anadolu Sağlık Meslek Lisesi Sayın Kurucu /Müdürümüze ve iş arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Tüm yaşamım boyunca her türlü imkânı bana sağlayan, başarılarımın esas kaynağını oluşturan ve verdikleri emeklerin karşılığını ödeyemeyeceğim babam Gürani CAN ve annem Necla CAN'a sonsuz teşekkür ederim.

Senanur CAN/Eylül 2018

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vi
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	5
3. GENEL BİLGİLER	9
3.1. Kanser	9
3.1.1.Kanser Gelişimi ve Nedenleri	9
3.1.2.Kanser Oluşumun Moleküler Temelleri.....	11
3.1.3.Kanser Tedavisi.....	14
3.1.3.1. <u>Korunma ve Erken Tanı</u>	15
3.2.Kemoterapi.....	17
3.3. Antineoplastik İlaçlar.....	18
3.3.1.Alkilleyici Ajanlar	21
3.3.1.1. <u>Siklofosfamid</u>	22
2.3.1.2. <u>Siklofosfamid'in Testiküler Toksisitesi</u>	24
3.4.Kemoterapi Sürecinde Serbest Radikaller	26
3.5.Kemoterapi Sürecinde Antioksidan Savunma Sistemi	28
3.5.1. Hipericum triquetrifolium tura ve Antioksidan Etkisi	29
4. MATERYAL VE YÖNTEM	32
4.1. Deney Hayvanları	32
4.2. Deney Grupları	32

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.3. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması	33
4.4. Kimyasal madde ve enjeksiyonlar	34
4.5. Sıçanlar Üzerindeki Cerrahi Uygulamalar ve Anestezi	34
4.6. Serum örnekleri.....	34
4.6.1. Plazma Malondialdehit (MDA) düzeyinin belirlenmesi	35
4.6.2. Glutasyon (GSH) düzeyinin belirlenmesi.....	35
4.6.4. Katalaz (CAT) seviyesinin belirlenmesi	36
4.6.5. Total Oksidan seviyenin belirlenmesi (TOS).....	36
4.6.6. Total Antioksidan seviyenin belirlenmesi (TAS).....	36
4.6.7. Oksidatif Stres İndeksinin Hesaplanması (OSİ).....	36
4.7. Testis doku örneklerinin histolojik analizleri	37
4.7.1. Hematoksilin-eozin (H-E) Boyama.....	37
4.7.2. İmmünohistokimyasal (Kaspaz 3, Bcl-2, Bax) Boyama	37
4.7.3. Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop (LTKM).....	38
4.7.3.1. <u>Testis Doku Örneklerinin Konfokal Mikroskopik Analizi</u>	38
4.8. İstatistiksel değerlendirmeler	38
5.BULGULAR VE TARTIŞMA	40
5.1. Biyokimyasal Analizler	40
5.2. Histolojik Analizler.....	50
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	58
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	60
EK AÇIKLAMALAR	70
.. Ek Açıklamalar-A.....	71
ÖZGEÇMİŞ	74

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.1 Kanser Oluşumu	11
3.2 Her iki tümör baskılayıcı alleldeki iki bağımsız mutasyon	12
3.3 Mutasyon ile kanser hücresi bölünmesi.....	13
3.4 Kemoterapötik İlaçların Sınıflandırılması.....	18
3.5 Antineoplastiklerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması	19
3.6 Hücre döngüsü.....	20
3.7 Siklofosamid; 2-bis (kloroetil) amino tetrahidro-2H-1,2,3-oksazofosforin 2 oksit .	22
3.8 Siklofosamid metabolizması	24
3.9 Oksidatif strese yol açan erkek üreme sisteminin primer patolojileri	27
3.10 Antioksidan savunma sistemleri.....	28
5.1 Tüm Gruplara ait serum MDA seviyelerinin ortalama ve standart hata grafiği.....	43
5.2 Tüm Gruplara ait serum TOS seviyelerinin ortalama ve standart hata grafiği.....	44
5.3 Tüm Gruplara ait serum OSİ seviyelerinin ortalama ve standart hata grafiği.....	44
5.4 Tüm Gruplara ait serum GSH seviyelerinin ortalama ve standart hata grafiği	45
5.5 Tüm Gruplara ait serum SOD seviyelerinin ortalama ve standart hata grafiği	46
5.6 Tüm Gruplara ait serum KAT seviyelerinin ortalama ve standart hata grafiği.....	47
5.7 Tüm Gruplara ait serum TAS seviyelerinin ortalama ve standart hata grafiği.....	48
5.8 Kontrol Grubu A: H-E, B: kaspaz-3, C: Bcl-2, D: Bax.....	51
5.9 CP grubu A: H-E, B: kaspaz-3, C: Bcl-2, D: Bax.	52

ŞEKİLLER DİZİNİ(devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
5.10 100 HP grubu A: H-E, B: kaspaz-3, C: Bcl-2, D: Bax.....	53
5.11 CP+100 HP grubu A: H-E, B: kaspaz-3, C: Bcl-2, D: Bax.....	54
5.12 Testis konfokal mikrograf görüntüleri.....	56

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.1 Kanserden korunma yolları ve beslenme önerileri.....	16
3.2 Siklofosfamidin fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	23
5.1 Deney gruplarına ait hayvanların kan serum örneklerinde belirlenen MDA, GSH, SOD ve CAT miktarlarının ortalama değerleri \pm standart hata değerleri (n=7).....	41
5.2 Deney gruplarına ait hayvanların kan serum örneklerinde belirlenen TAS, TOS ve OSİ miktarlarının ortalama değerleri \pm standart hata değerleri	42

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

ml	Mililitre (10^{-3} litre)
mg	Miligram (10^{-3} gram)
kg	Kilogram
nm	Nanometre
μm	Mikrometre
μmol	Mikromol
n	Denek sayısı (Adet)
rpm	devir/dakika
dk	dakika
g	gram
$^{\circ}\text{C}$	Celsius degree (santigrat derece)
g/mol	Molekül ağırlığı
g/cm^3	Yoğunluk

Kısaltmalar

Açıklama

ACR	Akrolein
AO	Antioksidan
AP	Amonyum persülfat
ATP	Adenosintriphosphate (adenozintrifosfat)
Bkz	Bakınız
CP	Siklofosamid
CAT	Katalaz
DNA	deoxyribonucleic acid (deoksiribonükleik asit)
DMSO	Dimetisülfoksit
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
FAM	Fosforamid Mustard
GSH	Glutatyon
HCl	Hidroklorik asit

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)**Kısaltmalar****Acıklama**

H-E	Hematoksilin ve Eosin
MDA	Malondialdehit
NAPDH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
PUFA	Poliansatüre yağ asiti
SOD	Süperoksit dismutaz
SOR	Serbest oksijen Radikalleri

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Çağımızın önde gelen hastalıklarından olan kanserin teşhis ve tedavisinde önemli gelişmeler olmasına rağmen, dünyanın birçok ülkesinde olduğu gibi ülkemizde de kanser en önemli sağlık problemlerinden biridir. Gelişmiş toplumlarda, ölüm nedenleri arasında 2. sırada yer alan kanserin 2030 yılına kadar küresel çapta hızla artarak ilk sıraya yerleşeceği öngörülmektedir. Bunun yanı sıra kanser hastalığının ve kanserin sebep olduğu ölümlerin yarısından fazlasının (% 64.9) az gelişmiş ülkelerde görüldüğü tespit edilmiştir (Çevik ve Pirinçci, 2017). Kanser oluşumu, somatik hücrelerin büyüme ve farklılaşmasını düzenleyen karmaşık mekanizmaların ortadan kalkması ve kontrolsüz bir şekilde çoğalması olarak tanımlanmaktadır (Giray vd., 1996).

Günümüzde kanser tedavisinde, hastaların metabolik özellikleri ve kanserli dokunun durumuna göre kemoterapi, radyoterapi ve ameliyat ile çıkarma yöntemlerinden bir veya birkaçı kullanılmaktadır (Kızılcı, 1999). Tedavi başarısına bakıldığında ameliyatla çıkarma veya radyasyon ile başarı yüzde yirmilerde iken, kemoterapi uygulamasının başarısı yüzde yetmişbeşlere kadar çıkmıştır. Fakat ortalama yaşam sürelerinin uzaması ile beraber kanser görülme sıklığı da artmıştır ve her 3 erkekte 1'i ve her 4 kadından 1'inin yaşam süresi içinde kanser ile karşılaşacağı bildirilmektedir (Türker ve Kayaalp, 2002).

Hücrenin biyokimyasal sürecini değiştiren ve hücrenin çoğalmasını engelleyen kemoterapi, genellikle sağlıklı hücrelere zarar vermeden apoptoz gibi hücre ölüm yollarıyla kötü huylu (malign) hücreleri yok eden ya da tümör gelişimini durduran kanser tedavi yöntemlerinden biridir (Can, 2005). Ancak kemoterapötik ilaçlar, malign hücreler yanında normal hücreleri de yok edebilirler. Bu ilaçların mutajenik, teratojenik ve karsinojenik etkileri vardır (Dural, 2008). Hatta en büyük sınırlayıcı faktör tümörün tedavide kullanılan ilaçlara karşı direnç geliştirmesidir (Kızılcı, 1999).

Kanser ilaçlarının farklı etki mekanizmaları vardır, bu nedenle tedavide bir veya daha fazla ilaç kombinasyonları kullanılmaktadır. Bu ilaçlar aynı zamanda saç, mukoza ve bilhassa üreme hücreleri gibi hızlı çoğalan normal hücreleri de etkileyerek hastada yorgunluk, saç dökülmesi, kanama, enfeksiyon, ağız içi iltihabı ve diare gibi farklı yan

etkilerin görülmesine neden olur. Buna ek olarak kalp, böbrek, solunum sistemi ve özellikle üreme sisteminde çoklu organ toksisitelerine yol açabilir. Yan etkilerinin şiddeti ve sıklığı hastadan hastaya farklılık göstermekle birlikte yan etkilerin kontrol altına alınamaması hastaların tedaviden kaçmasına, ilaç dozunun azaltılmasına ya da tedavinin reddedilmesine sebep olur (Can, 2005). Bu tip nedenlerden dolayı tedaviyi destekleyen bitkisel kaynaklı bileşikler tedaviye dahil edilmelidir.

Kemoterapötiklerden biri olan antineoplastik ilaçların bu yan etkileri hücre döngüsünün aşamalarına bağlıdır (Boxtel, 2001). Hücre döngüsünün özel bir dönemine etki ederek hücrenin bölünmesini engelleyen ilaçlara “hücre döngüsüne bağımlı ilaçlar” denir. Hücre döngüsüne bağımlı olmaksızın her düzeyde etki eden ilaçlara da “hücre döngüsüne bağımsız ilaçlar” denir (Dural, 2008).

Kanser tedavisinde kullanılan ilaçların en fazla kanser yapıcı olanları alkilleyici tipte (siklofosfamid, karmustin, klorambusil, prokarbazin vb.) olanlarıdır (Kayaalp, 1989). Alkile edici ajanların en fazla gonadotoksik kemoterapi ilaçları olduğu ve gonadal hasar derecesinin alınan alkilleyici ajan dozu ile ilişkili olabileceği yaygın olarak düşünülmektedir (Smart vd., 2018). Alkilleyici ilaçların kemoterapide dozunu kısıtlayan en önemli etkisi ise bağışıklık sistemini baskılaması (immunosupresyon)’ dır (Turc ve Poulter, 1972; Kawabata vd., 1990).

Bir oksazafosforin alkilleyici ajan olan siklofosfamid (Cyclophosphamide; CP), antiinflamatuvar ve immüno-supresif bir ilaçtır. CP’nin sitotoksik etkisini gösterebilmesi için metabolik olarak aktive edilmesi gereklidir.

CP, karaciğerde metabolize olarak fosforamid mustard (FAM) ve akrolein (ACR) olarak iki temel metabolite ayrılır. En aktifleri FAM olan bir dizi alkilleyici ajandır. FAM, bir alkil molekülünü DNA’ya bağlar ve DNA replikasyonunu engeller (Dollery, 1999). FAM’a, sisplatin veya doksorubisin gibi alkilleyici ajanlara maruz kalma, germ hücresi kaybına neden olur (Coggins vd., 1960; Smart vd., 2018). ACR ise serbest radikaller yoluyla önemli makromoleküllerin oksidatif hasarına neden olur (Atasoy, 2016). CP’in toksik metabolitleri, COOH, SH, NH₂, PO₃ ve OH grupları ile reaksiyon vererek DNA ve proteinlerle çapraz bağ oluşturabilir (Todorova vd., 2009).

Günümüzde CP gibi antikanser ilaçların, sitotoksik etkisini gösterebilmeleri için kanser hücrelerini seçmesi mümkün değildir. Selektif özelliği olmadığından dolayı kemik iliği, saç folikülleri ve bağırsak mukozası gibi yüksek proliferasyona sahip olan, sağlam dokular için de toksik olan bir ajandır. Antikanser ilaçlar gonadları da etkiler. Ancak gonadlar hayati tehlike içeren semptomlar vermediğinden, diğer organlara göre daha az çalışılmıştır. Yapılan çalışmalar antikanser ilaçların, antioksidan enzim sisteminin etkinliğini azaltarak, hücreleri SOR'a karşı savunmasız bırakır. Bunun sonucunda oluşan oksitatif stres testis dokusunda ve germ hücrelerinde hasara yol açmaktadır (Vardı vd., 2010).

Canlılarda serbest radikallerin yoğunluğu artarsa antioksidan sistemin savunucu etkisi yeterli gelmeyip metabolizmada bir takım hasarlar meydana gelebilmektedir (Bendich, 1990). Çeşitli çalışmalar; serbest radikaller, lipid peroksidasyonu ve ürünleri ile tümörögenезis arasında kuvvetli bir bağlantı bulunduğunu göstermiştir (Akkuş, 1995).

CP'nin toksik etkilerini önleyerek etkin olan daha yüksek dozlarda kullanılmasına olanak sağlayan yöntemler geliştirilmiş ise de halen ilaç uygulama sistemleri daha duyarlı olabilecek metodların arayışı içindedir (Ayhancı vd., 2008). Siklofosfamidin toksik yan etkilerinden kaçınmak için bazı antioksidan ajanların kullanılması ve özellikle ACR nedeni oluşan serbest oksijen radikallerin (SOR)'nin etkisiz hale getirilmesi gerekir. Bu yüzden normal dokuları kemoterapi nedeni toksisitelerden korumak ve tümör oluşumunu ve uyarımını engellemek için yeni koruyucu ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır (Gunes vd., 2016).

Lipit peroksidasyonunun kanser yapıcı etkisinin olabileceği düşüncesi; çalışmaları çeşitli bitkisel AO'ların kanser oluşumu üzerine etkilerini araştırmaya yöneltmiştir (Byers ve Perry, 1992). AO'ların karsinogenезin başlama ve ilerleme dönemini baskıladıkları, apoptosizi indükledikleri bulunmuştur (İşcan ve Çoban, 1998).

Son araştırmalarda bazı antioksidanların, antikanser ilaçların toksisitelerini azaltarak, daha etkin olan yüksek dozlarının kullanılmasına olanak sağlayabileceği ileri sürülmüştür (Block vd., 2007; Ladas vd; 2004; Borek, 2004).

Bu açıdan bakıldığında Ülkemiz birçok antioksidan içerikli bitki türüne ev sahipliği yapmaktadır. Kantaron türleri de doğal olarak yetişen ve antioksidan, antibakteriyal, antidepresif özelliklerinden dolayı halk arasında geleneksel ilaç olarak yaygın bir şekilde kullanılan bitki türleridir. Hipericum (kantaron) türleri içerisinde antikanser özellik kazanmasını sağlayan kimyasal bileşenler: flavon türleri, tanen, uçucu yağ, terpenoidler ve fenolik bileşiklerdir. Fakat bu özelliğin Hipericum türlerinin içerisinde yer alan hiperisin ve hiperforin gibi etken maddelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bunlara ek olarak son yıllarda yapılan çalışmalarda kantaron çeşitlerinde kırmızı renk verme özelliğinden de sorumlu protohiperin ve pseudohiperin gibi yapıların yer aldığı belirlenmiştir (Karaoğlan, 2014).

Bu çalışmada *Hipericum triquetrifolium* Turra (HT) bitki ekstresinin farklı dozlarının CP nedenli oksidatif stres ve testiküler toksisiteye karşı testis dokusunu koruyucu etkisinin araştırılması amaçlandı.

2.LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

Kanser, hücre içerisinde genetik değişikliklerin oluşması sonucu denetimsiz hücre çoğalması ile karakterize olan bir hastalıktır. Bu genetik değişiklikler hücre bölünmesini kontrol eden genlerin mutasyonu ile onkogenlerin aktivasyonu veya tümör supresör genlerin (p53, v.b.) inaktivasyonu gibi bir dizi reaksiyonları içerir (Türk, 2013). Bununla birlikte kanser, her ne kadar fizyolojik bir hastalık olarak tanımlansa da bireyin ve çevresinin psikolojisinde, duyu durumunda ve sosyal yaşamında derin izler bırakan modern hayatın tehdit edici ve en yaygın hastalıklarındandır (Kara, 2015).

Çeşitli tedavi yöntemlerinden biri olan kanser kemoterapisi, yaklaşık 60 yıl önce ağız ve damar yolu ile uygulanmaya başlayan tedavi yöntemidir (Kara, 2015). Kanser kemoterapisi, özellikle anormal çoğalan hücrelere karşı savaşan, fakat maalesef sağlıklı doku ve organlara zararlı etkileri olan, çeşitli kimyasal, biyolojik ve hormonal kemoterapötik (antikanser) ilaçlarla yapılan tedavi şeklidir (Oh ve Baik, 2009; Türk, 2013). Kemoterapinin başarılı olması ilacın antikanser etkisi ile toksisitesi arasındaki dengenin iyi kurulmasına bağlıdır.

Antikanser etkili ilaçlar sağlıklı doku ve organlarda yan etkilere sahip olduğu için erkek fertilitésinin bozulması bu ilaçların üreme sisteminde meydana getirdiği negatif faktörlerden biridir (Türk, 2013). Bu nedenle antikanser ilaçların sınırlı dozajlarda uygulanması bireylerde çok büyük zararlara yol açmadan tedavi edici olabilir (Heath ve Davis, 2008). Kanser tedavisi için çeşitli stratejik gelişmeler olmasına rağmen hâlâ çözümlenmeyen en büyük problemlerden biri de insan tümörlerinin antikanser ilaçlara karşı direnç geliştirmesidir (Zhang vd., 2009). Bu dirence rağmen tedavide sonuç alabilmek için tümörlü hastalara yoğun bir kemoterapi uygulanmaktadır. Bunun için özellikle CP gibi yüksek doz alkilleyici ajanlar kullanılmaktadır (Cavalletti vd., 1986). Bir oksazofosforin alkilleyici ajan olan CP, DNA sentezini değiştirerek hücrelerin çoğalmasını engeller. CP çok yaygın kullanımı olan bir ilaç olmasına rağmen (Dollery, 1999) çoklu organ toksisitesi göstermesi nedeniyle klinik yararlanımı sınırlandırılmaktadır (Brock vd., 1982). Ayrıca hematolojik malignitelerin tedavisi sırasında gonad fonksiyonları, kullanılan her bir ajana bağlı olarak hastanın yaşı ve verilen doz miktarına göre değişik şekillerde

etkilenir. Gonadları en çok etkileyen alkile edicilerin başında CP gelmektedir. CP'nin tek başına kullanımının uzamış azospermiye neden olduğu görülmüştür. CP ile tedavi edilen erişkin erkek hastalarda spermatogenez belirgin olarak bozulmaktadır. Kadınlarda ise amenore, folliküller üzerinde hasar ve infertilite etkisi oluşur (Dilek, 2010). Örneğin gebe sıçanlar üzerinde yapılan bazı çalışmalarda gebeliğin ilk 16 gününde CP'ye maruziyetin arttığı ve hücre içi nükleolar fragmantasyonlara yol açtığı bunun sonucunda da erkek fetüslerde spermatogenezin bozulduğu tespit edilmiştir (Tara vd., 2003).

Williams vd.'nin (2008) CP gibi alkilleyici bir ajan olan ifosfamid ile yaptıkları bir çalışmada kanserli 32 hastanın 2/3'ünün sperma analizlerinde elde ettikleri sonuçlarda erkek hastaların ifosfamid gonadotoksitesine karşı kadınlara göre çok daha hassas olduklarını göstermektedir.

Reiter vd.(1998) yaptığı bir diğer çalışmada ise seminomalı 22 hastanın başka bir versiyon ilaç (karboplatin) ile tedavisinde azospermi oluşmadığını, oligosperminin 7 kişide, FSH düzeyinde artışın ise 14 kişide olduğunu ve hastaların iyileştikten sonraki dönemde fertilitelerini kazanma ihtimallerinin yüksek olduğunu bildirmektedirler.

CP ile yapılan birçok çalışmada sperm yapısının bozulduğu ve üreme yeteneğinin kaybolduğu rapor edilmektedir. Yetişkin hastalarda günde 1-2 mg/kg CP kemoterapisi 4 aydan daha fazla uygulandığında oligospermi ve azospermi görülmüştür (Kim vd., 2013).

CP ile kanser tedavisi gören çocuklarda, germinal epitel üzerinde çok ciddi toksisite problemleri oluşmaktadır. Tedavi sonrası 20 yıl süregelen azospermi ve hatta kalıcı sterilite gelişmekte olup bunun nedeninin de sperm üretimindeki yetersizliklerden kaynaklandığı düşünülmüştür (Türk, 2013).

CP'nin üreme çağındaki bireylerde en önemli yan etkisi ise germ hücreleri üzerine bir takım metabolitlerin toksisitesidir. Germ hücrelerinde kalıtsal bozulmalara, spesifik bölgelerde mutasyonlara ve malformasyonlara sebep olabilmektedir. Bu aktif metabolitlerinden biri olan ACR lipid peroksidasyonunu (LPO) başlatıcı bir araçtır. CP nedenli toksisitelerin başlıca sebeplerinden biri ise LPO'dur. Doku antioksidan sisteme akrolein müdahale eder ve yüksek ROS üretimini sağlar. Oysa düşük ROS seviyesinin

korunması sperm aktivasyonunda çok önemlidir (Çeribaşı vd., 2009). Oluşan oksidatif stres üreme bozukluklarının patogenezinde ve sperm kusurlarının oluşmasında kritik rol oynar. Çünkü sperm plazma membranı yüksek oranda doymamış yağ asitleri (PUFA) içerir ve sitoplazmanın hacim ve lokalizasyonunu aşırı sınırlandırır. Yani aşırı ROS üretimi LPO yoluyla spermatozoaya zarar verir, bu da metabolizma, motilite ve akrozom reaksiyonunun bozulmasına neden olur (Aitken, 1993; Alvarez ve Storey, 1995).

Son yıllarda kanser üzerine çok fazla çalışma yapılmasına rağmen kesin bir tedavi yöntemi halen netleşmemiştir. Kanser, belli bir sonu olan, tıbbi tedaviyle ilişkili tekil bir yaşam tarzı olarak düşünülemez (Kara, 2015). Üzerinde çalışılması gereken alternatif yöntemler ile desteklenmek zorundadır. Günümüzde antikanser ajanların yan etkilerini azaltmak için geliştirilen yeni ilaç sistemlerine ilgi yoğunlaşmıştır. Biz de çalışmamızda istenmeyen yan etkiler ve toksisite problemlerini çözmek için antioksidan özelliği olan *Hipericum triquetrifolium* Turra (HT) bitkisinin sıçanlarda kemoterapi nedenli testiküler toksisitesine karşı koruyucu etkisini araştırdık.

Chen vd. 2009 yılında *Hipericum* türlerinin toprak üstü kısımlarının antioksidan içeriklerini, antioksidan enzimlerini ve onların aktivitelerini araştırmış ve bu özellikleri ortaya koyan sonuçlar elde etmişlerdir.

Bu özellikleri ortaya koyan çalışmalardan biri olan Apaydın vd.'nin 1999'da fareler üzerinde yaptığı deneyde, kantaron türlerinden HT'nin metanol özütünün antinosiseptif aktiviteye sahip olduğunu rapor etmişlerdir. HT bitkisinin sıçanlara verilmesi ile doza bağlı olarak yangıyı engellediğini göstermişlerdir (Apaydın vd., 1999).

Hışıl vd. 2005 yılında kantaron bitkisi ile yaptıkları çalışmalarda bitkinin antioksidan ve antidepresan etkisini ortaya koymuşlardır. Ayrıca bu bitkinin Avrupa'da ve Amerika'da orta şiddette depresyon tedavisinde geleneksel olarak kullanıldığını bildirmişlerdir. Bu özelliklerin bitki içerisindeki Hiperisinden kaynaklandığını ve bunun antikanserojen ajan olarak önem kazanmaya başladığını bildirmişlerdir.

Sıçanlar üzerinde yapılan başka bir çalışmada Öztürk vd.,(2002) HT'nin değişik dozlarını farklı sürelerde denemiş ve iltihaplanmayı önleyen bir ajan olarak kullanılabileceğini iddia etmişlerdir.

Yine 2002 yılında Conforti vd., HT'un daha önceki çalışmalarda gösterilen antioksidan özelliklerinin yanında, bu bitkiden elde edilen polifenolik bileşenlerin antitümoral etkilerini araştırmışlardır. Conforti ve ark.'nın yaptıkları bu çalışmada ilk defa HT'un topraküstü kısımlarının metanol ekstratının kuersetin-3-O-galaktosid, kamferol-3-O-glikozid, (-)-epikateşin ve hyperisin gibi flavonoidlerinin önemli antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada, antioksidan düzeylerini belirlemek amacıyla DPPH(2,2-difenil-1-pikrilhidraz) ve TBA (Tiobarbitürik asit) yöntemlerini kullanmışlardır.

Yine Saad vd. 2008 yılında insan monosit hücrelerindeki kültür çalışmalarında HT'nin tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) ve interlökin 6 (IL-6) üretimini engellediğini deneysel sonuçlarında göstermişlerdir.

3. GENEL BİLGİLER

3.1. Kanser

Kanser, organizmanın savunma mekanizmalarının kesilmesi ve dengesinin bozulması durumunda, başlangıçta sağlıklı olan hücrelerin beden denetiminden çıkarak önlenemez bir büyüme ve yayılmasıyla karakterize olan ölümcül olabilen bir hastalıktır (Murray vd., 1997).

Kanser sağ kalımı düşük, tedavi edilebilirliği güç ve görülme sıklığı giderek artan bir hastalıktır (Üstündağ, 2013). Günümüzde Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan istatistiksel bir araştırmaya göre erkeklerin yarısı (%45) ve kadınların da üçte biri (%38) yaşamlarının bir evresinde kansere yakalanma riski altındadır (Memişoğlu, 2016, Allison 2014).

Vücudun 12 bölgesinde ortaya çıkan kanserler toplam kanser olgularının %80'ini oluşturur. Kanselerin yarısından fazlasını oluşturan 4 kanser türü prostat, meme, akciğer ve kolon/rektum kanserleridir (Cooper, 2016). Uluslararası Kanser Araştırma Kurumu (The International Agency for Research on Cancer-IARC) 2030 yılında kanser insidansında %1'lik artışla kanserden ölümlerin 17 milyona çıkacağını öngörmektedir. Türkiye 2013-2023 yılları arasında yaşa bağlı hız projeksiyon değerleri, kanser yükünün yaşlanma ile birlikte arttığını göstermektedir (TKA, 2018). T.C Sağlık Bakanlığı'nın 2006 verilerine göre ülkemizde kanserden ölümlerin yüzbinde 229 olduğunu açıklamıştır (Üstündağ, 2013).

Kanserin tam ve etkin kontrolü dinamik, çok yönlü, bilimsel, multidisipliner ve maliyet etkin bir program ile mümkün olabilecektir (TKA, 2018).

3.1.1. Kanser Gelişimi ve Nedenleri

Çağdaş tıbbın en önemli ve güncel sorunlarından biri olan kanser, normal vücut hücresinin değişimi (mutasyon) ve denetimsiz olarak hızla çoğalması sonucu oluşan kronik bir hastalıktır (Kara, 2015). Birçok kanser türünün ileri yaşlarda ortaya çıkması kanserin

çok aşamalı bir olay olduğunu gösterir. Kanser görülme sıklığının yaş ile büyük ölçüde artması, uzun yıllar boyunca genetik materyalde biriken çok sayıda anomalinin gelişmesi yüzündendir (Cooper, 2016).

Kanser her ne kadar genetik bir hastalık olarak tanımlansa da, başta sigara kullanımı olmak üzere beslenme, solunan hava, yaşanılan çevre şartları ve diğer birçok faktör ile de ilişkilendirilebilir (TKA, 2018). Tütün ve tütün ürünleri insanlarda akciğer, ağız boşluğu, geniz ve sinüsler gibi birçok organda kanser nedeni iken serviks uteri ile miyeloid lösemi kanserlerini tetikleyicisidir (Kara, 2015).

Bugüne kadar bilinen en ölümcül kanser olan akciğer kanseri, kansere bağlı ölümlerin %25'inden sorumludur (Cooper, 2016). Akciğer kanserlerinin %90'ı sigara kullanımına bağlı olarak ortaya çıkmakta, 10 yaş altı her üç çocuktan biri pasif içiciliğe maruz kalmakta, her gün 300 kişi sigaraya bağlı gelişen hastalıklar nedeniyle hayatını kaybetmektedir (Memişoğlu, 2016).

Etkin bir şekilde sigara içimi insidansı takip edilip, tütün kontrolü sağlandığında bile her yıl yaklaşık 110.000 hayat kurtarılabilecektir (TKA, 2018).

Kanser ile beslenmenin önemli bir ilişkisi olduğu fikri yeni değildir. 1270 yılında Yong-He Yan kötü beslenmenin özofagus kanserine neden olacağını, Wisemen ise 1676 yılında kanserin beslenmedeki bir hatadan kaynaklandığını söylemiştir. (Kara, 2015). Tüm kanser vakalarının beslenmeyle ilişkisi % 10-70 arasında değişip, ortalama % 35'tir. Yani yaklaşık kanserin üçte birine yediklerimiz ve içtiklerimiz yol açmaktadır (Arı vd., 2017; Çevik ve Pirinçci, 2017).

Hayvan denemeleri, in vitro denemeler ve klinik bulgularla desteklenen epidemiyolojik çalışmalar; meyve, sebze, tam tahıllar, diyet lifi, yağlar ve fiziksel aktivite ile kanser riski arasında negatif bir ilişki olduğunu göstermiştir. Toplam yağ alımı, beden kitle indeksi, gıda hazırlama yöntemleri (turşu, tuzlama, tütsüleme, yüksek sıcaklıklarda pişirme vb.) ve obezite ile kanser arasında pozitif ilişki olduğunu göstermiştir (Kara, 2015).

Kanser hücreleri, çevresel faktörlerin etkisiyle birçok basamaktan oluşan bir süreç içinde, hücre DNA'sında ve genlerde oluşan değişiklikler sonucu kontrolsüz çoğalarak normal olmayan bir oluşum meydana getirirler. Bu oluşum komşu dokulara ve uzak organlara yayılabilir (Şekil 3.1) (Ringer ve Schnipper, 2001) .



Şekil 3.1 Kanser Oluşumu (Ringer ve Schnipper, 2001)

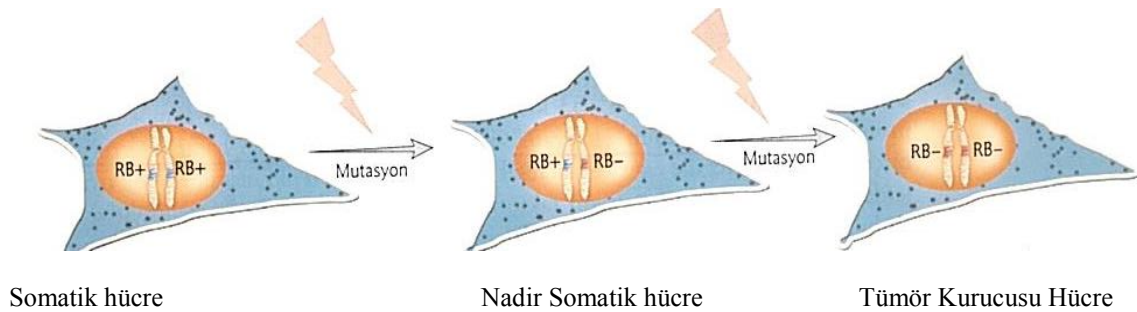
3.1.2.Kanser Oluşumunun Moleküler Temelleri

Normal hücrelerin belli bir ömrü vardır, düzenli şekilde büyürler, bölünürler ve yaşlandıklarında veya tamir edilemez hasarlar meydana geldiğinde ölürler (Allison, 2014). Bu süreçler hücre üremesine, yani hücre döngüsüne bağlıdır. Hücre döngüsünün kontrolden çıkması kanser oluşumunda asal bir rol oynar. Herhangi bir dokudaki tek bir hücrenin transformasyona uğraması ile anormallik başlar. Bu anormalliğin temel sebebi bir veya daha fazla gendeki değişiklik sonucu işlevleri değişmiş protein ürünleridir. Transforme olmuş hücreler kontrol mekanizmalarının denetiminden kurtulup kontrolsüz ve hatalı bir biçimde çoğalmaya devam eder. Bu olay normal hücreyi kanser hücresine çevirir (Reece vd., 2013). Bu oluşumların, DNA onarım enzimleri tarafından uzaklaştırılması ve tamiri söz konusudur. Ancak onarım mekanizması tamamlanmadan hücrenin bölünmesi DNA hasarının kalıcı hale gelmesine ve mutasyona neden olur (Ames, 1997; Farber, 1982). Kritik genlerde oluşan mutasyonlar tümör gelişimine yol açarlar. Örneğin, insanda görülen tümörlerin yarısından fazlasında tümör supressör gende (p-53) mutasyonların olduğu saptanmıştır (Farber, 1982).

Bir tümör oluştuğu doku içerisinde kalabilir veya büyümesi için gerekli kanı, angiogenez adı verilen bir süreçle temin ederek komşu dokuları istila edebilir (invazyon). Kanser hücreleri sıklıkla oluştukları yerden çıkıp uzak dokulara ulaşır, orada yeni tümörler oluşturabilir (metastaz). Bu tür tümörler malignant (kötü huylu) olarak adlandırılır (Memişoğlu, 2016). Hipokrat, kötü huylu bir tümörün bu doyumuz büyümesini tanımlamak için, Yunanca yengeç anlamındaki *carcinoma* terimini kullanmıştır (Allison, 2014).

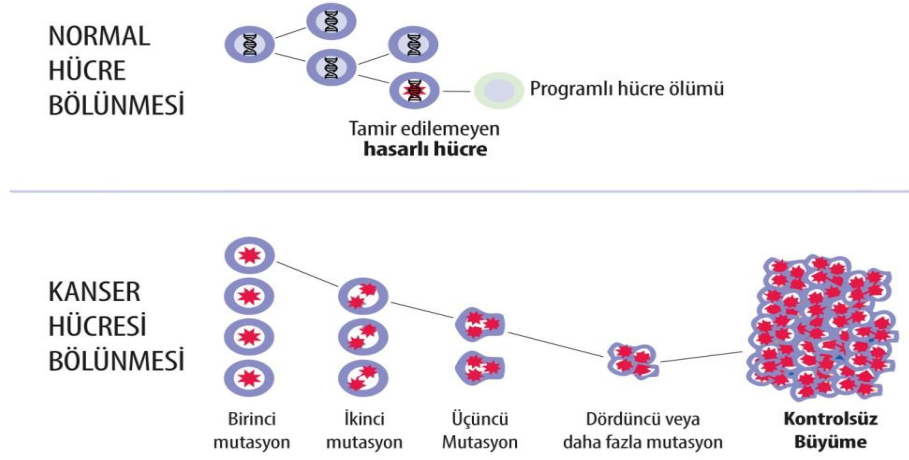
Kanser çok adımlı bir basamaktır. Bir kanser hücresinin ortaya çıkması, 4 ila 8 yıl arasında genetik değişikliğin birikmesini gerektirir. (Allison, 2014). Karsinogenez olarak adlandırılan bu kanser gelişim süreci inisiyasyon (başlangıç), promosyon (artma, gelişme) ve progresyon (ilerleme) olmak üzere üç aşamadan oluşur. Başlangıç safhası geri dönüşümsüz bir olaydır, gen ekspresyonunu düzenleyen epigenom, kromozom ve DNA hasarı ile kendini gösterir. Başlangıç aşamasını uzun bir süreç olan gelişme evresi takip eder. Gelişme evresi kısaca premalign tümör hücre popülasyonunun inflamasyonla birlikte genomik olarak kararsız hücrelerin büyümesi olarak tanımlanabilir. İlerleme safhasında ise hücreler çoğalırken, genomlarına daha fazla zarar vererek kötü huylu tümöre dönüşür (Çiftçi, 2017).

Tek bir mutasyon hücrenin dönüşümü için yeterli değildir. Kanserli yapıya dönüşüm iki bağımsız mutasyonun bir lokustaki her iki tümör baskılayıcı alelin fonksiyonunu kaybetmesi durumunda oluşur. Mutasyonların iki temel sebebi vardır; birincisi kalıtsaldır ve ikincisi sporadiktir (tek bir bireyde ortaya çıkar, kalıtsal değildir.) (Allison, 2014; Memişoğlu, 2016) (Şekil 3.2) (Şekil 3.3).



Şekil 3.2 Her iki tümör baskılayıcı alleldeki iki bağımsız mutasyon (Allison, 2014).

KANSER: NORMAL BÜYÜMENİN KONTROLÜNÜN KAYBEDİLMESİ



Şekil 3.3 Mutasyon ile kanser hücresi bölünmesi (Yağcı, 2017).

Kansere neden olan çok sayıda gen tanımlanmıştır ve çeşitli mekanizmaların bu genler aracılığıyla insanda kanserlerin oluşumuna katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Yağcı, 2017).

Kanser gelişme riskini arttıran gen mutasyonları kalıtlabilir veya sonradan edinilebilir. Edinilmiş olanlar, DNA replikasyonu sırasında kendiliğinden veya çevresel etkiyle oluşan hatalardan kaynaklanır.

Tümörögenезle ilişkili genetik değişiklikler iki gruba ayrılır. Bunlar bir fonksiyonun kazanılması ile oluşanlar (proto-onkogenlerdeki aktivasyon) ve bir fonksiyonun kaybedilmesi ile oluşanlar (tümör süpressör genlerdeki inaktivasyon) dır (Allison, 2014). Onkogenlerin oluşmasına öncülük eden hücrel genlere proto-onkogenler denir. Bunlar (src, ras ve raf), hücrede önemli rol oynayan, genellikle hücrenin normal çoğalmasını denetleyen sinyal yollarında görev yapan genlerdir. Onkogenler ise proto-onkogenlerin anormal eksprese olan veya mutant şekilleridir. Onkogenler 3 harfli bir kod ile gösterilir. Örneğin Ras genleri insan tümörlerinde en sık görülen onkogenlerdir. Ras genleri insan kanserlerinin %25'inde, kolon kanserlerinin %50 sinde ve akciğer kanserlerinin %25'inde rol oynar (Cooper, 2016).

Genetik materyalin denetiminden sorumlu tümör süpressör genleri hücrenin büyümesini engelleyen genlerdir. Bu genlerin en kapsamlı tanımlanmış olanı p53 genidir. Normal koşullarda pek az eksprese olan p53 geni DNA hasar kontrol sisteminin birçok bileşenini düzenler ve hasarın niteliğini değerlendirir. Bir bakıma, p53 DNA'nın bütünlüğünden sorumlu "genomun gardiyanı" olarak kabul edilir. DNA hasarı p53 ü aktive eder. Hücre döngüsünün bulunduğu safhaya bağlı olarak, DNA hasarı iki önemli sonuç doğurur; ya hücre döngüsü durdurulur ve DNA replikasyondan önce onarılır veya apoptoza uğrar. Eğer DNA G1'in erken aşamasında zarar görürse kontrol noktası hücre döngüsünü bloke eden p53 tarafından tetiklenir. P53 bir CDK inhibitörünü kodlayan p21 genini aktive eder. İnhibitör siklin D-CDK4 ve siklin E-CDK2'nin aktivitesini önler ve G1 aşaması durdurulur. (Allison, 2014).

P53 genindeki mutasyonlar, meme, karaciğer, prostat, akciğer, deri ve kolon kanserlerini içeren birçok kanser ile bağlantılıdır. Kanserlerin %80 inde ya 17. Kromozom üzerindeki her iki alel delesyona uğramıştır ya da alellerden birinde yanlış anlamlı nokta mutasyonu vardır. Aynı zamanda p53 mutasyonları tedaviye direnci de belirler. Tümör hücreleri apoptotik ölümden kaçacak mekanizmalar geliştirirler. Apoptotik ölüme direnç kanser hücrelerinin önemli özelliklerinden biridir. Apoptozise direnci belirleyen bcl-2 ailesi proteinleridir. Böylece 'ölümsüzleşen' tümör hücreleri genetik materyallerindeki birçok anormalliğe rağmen yaşamaya ve çoğalmaya devam ederler (Demirelli, 2003).

3.1.3.Kanser Tedavisi

Kanser üzerine yapılan araştırmalar yaklaşık 14. yüzyıldan bu yana devam etmektedir. İlk kez 1915 yılında tavşanların kulaklarına katran uygulanmasıyla deneysel olarak oluşturulmuştur. Kanser söz konusu dönemde tedavisi olmayan bir hastalık olarak bilinmekteydi. Bu da tanıda gecikmelere yol açmakta ve tedaviyi güçleştirmekteydi. Oysa kanser, tedavisi mümkün bir hastalıklar grubudur. Kanser tedavisinde başarının ilk adımı insanlarda kanserin nedenlerini belirlemektir (Kutluk ve Kars, 1992).

Kanser tedavisi için, ilaçların araştırılma ve geliştirilme çalışmalarında her zaman deneysel çalışmalara gereksinim duyulmuş ve çeşitli modeller kullanılmıştır (Manson vd.,

2000). Diğer bütün tedaviye yönelik denemelerde olduğu gibi kanser araştırmalarında da deneysel modelleri kullanmak zorunluluğu vardır (Yuspa ve Poirier, 1998).

Kanser tedavisi tümörün histolojik yapısına, metastaz varlığı olup olmamasına ve hastalığın aşamasına göre belirlenir (Perry, 2008).

Günümüzde uygulanan kanser tedavi yöntemleri; cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, immünoterapi ve kemik iliği transplantasyonudur. Bazı durumlarda hastalığın cinsi ve yaygınlığına göre bu yöntemler birlikte kullanılır. (Ölgen vd., 2002). Cerrahi yolla yapılan tedavilerde amaç tümörlü olan doku ve organın vücuttan çıkarılması iken; radyoterapi ve kemoterapi ile yapılan tedavilerde ise amaç kanserli hücrelerin yok edilerek ortadan kaldırılmasıdır (Limandal, 2013)

3.1.3.1.Korunma ve Erken Tanı

Kanser ile mücadelenin en etkili yolu hastalığın ortaya çıkmasını önlemektir. (Cooper, 2016). Tüm kanser vakalarının ve ölümlerinin yaklaşık 1/3'ü beslenme ile ilişkilidir. Bu yüzden sağlıklı beslenme, fiziksel aktivite, sınırlı alkol kullanımı ya da hiç kullanmamak ve sigara kullanmamak kanserden korunmak için önemli kriterlerdir (Arı vd., 2017) (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 Kanserden korunma yolları ve beslenme önerileri (Arı vd., 2017)

Beslenme Önerileri	Açıklama
<ul style="list-style-type: none"> Sağlıklı vücut ağırlığını sağlamak ve korumak 	Vücut kitle indeksinin 21-23 arasında korunması
<ul style="list-style-type: none"> Günlük enerjinin %15-30'unun yağlardan alınmasını sağlamak 	
<ul style="list-style-type: none"> Kırmızı et protein enerjisini günlük %10 ile sınırlamak 	günde <80 gramdan az
<ul style="list-style-type: none"> Kırmızı et yerine beyaz etin tercih edilmesi 	tavuk, balık eti gibi
<ul style="list-style-type: none"> Günlük taze sebze ve meyve tüketimini en az beş porsiyon ve üzerine çıkartmak 	günlük 400/800 gram
<ul style="list-style-type: none"> Kuru baklagiller ve diğer yiyeceklerin tüketimi arasında denge kurmak 	
<ul style="list-style-type: none"> Karbonhidratlı yiyeceklerin alımını, çay şekeri yerine, pekmez ve bal tüketilecek şekilde arttırmak 	
<ul style="list-style-type: none"> Pişirme yöntemlerinden kömür ızgarası ve kızartmalardan, tütsülenmiş yiyeceklerden, turşu ve salamura gibi fazla tuzlulardan kaçınmak, düşük ısıda pişirmeye dikkat etmek 	
<ul style="list-style-type: none"> Yiyecekleri küf ve mantar oluşunu engelleyecek koşullarda saklamak 	bozulabilir besinleri soğutarak ve dondurarak saklamak
<ul style="list-style-type: none"> Yiyeceklerdeki çeşitli kimyasal kontaminantların, pestisitlerin, atıkların ve katkı maddelerinin güvenli sınırlarda olup olmadığının belirlenmesine ve takip edilmesine dikkat etmek 	
<ul style="list-style-type: none"> Düzenli fiziksel aktivite yapmak 	
<ul style="list-style-type: none"> Alkol, sigara, katkı maddesi içeren yiyeceklerin tüketiminden kaçınmak 	

İkinci ve etkili başka alternatif de, tümör gelişimini daha malign şekle dönüşmeden önce, kolayca tedavi edilebileceği aşamada saptamaktır. Vücuda yayılıp metastaz

yapmadan önce saptandığında, kanserin birçoğu ameliyat ya da radyasyon gibi lokal tedavi girişimleri ile iyileştirilebilir (Cooper, 2016).

Meme, serviks ve kolorektal kanserlerinde belli tümörlerdeki DNA'nın dizi analizinin hızla yapılabilmesi gibi uygun programlar yürütüldüğünde kanser tedavisi artık kişiye özgü hale gelmeye başlamıştır. Ülkemizde mevcut verilere göre tespit edilen meme, serviks ve kolorektal kanserlerinin büyük çoğunluğu bölgesel ve uzak metastaz düzeyinde olmaktadır. Etkin bir kanser kontrolünde hastaların kaliteli ve uzun yaşam sürmesi için hastalığın en iyi şekilde tedavi edilmesi ve palyasyonunun en iyi şekilde sağlanması gerekir (Reece vd., 2013; TKA, 2018).

3.2.Kemoterapi

Kemoterapi sözcüğü ilk defa 1900'lerin başında enfeksiyon hastalıklarının tedavisi için ilaçlar geliştiren ünlü kimyacı Paul Ehrlich tarafından kullanılmıştır (Ateş ve Olgun 2014). Kemoterapi 1960'lı yıllara kadar da palyatif amaçla, bazı klinik bulguların azaltılması ve hastanın yaşamını biraz daha uzatmak amacıyla kullanılmıştır. Ancak 1960'lı yıllardan itibaren hücre hakkında bilgiler arttıkça yeni ilaçlar laboratuvarlarda antikanser aktiviteleri açısından araştırılmaya başlanmıştır (Pizzo vd., 2001).

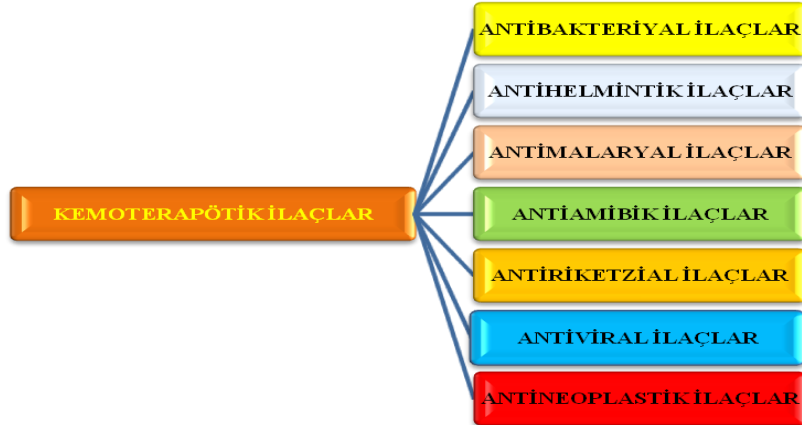
Kemoterapi, doğal ya da sentetik kimyasal maddeler, biyolojik ajanlar veya hormonlar ile yapılan tedavilerin tamamını içine alan tedavi şeklidir (Atasoy, 2016).

Kanser kemoterapisinin esası; antibakteriyal ilaçların bakterileri öldürdüğü gibi hastanın normal hücrelerine zarar vermeden kanser hücrelerini öldürmek ve tedavi sağlamaktır. Ancak antineoplastik ilaçların kanser hücresine olan seçicilikleri, antibiyotiklerin bakterilere karşı olan seçiciliklerinden daha azdır. Çünkü malign hücre ile normal hücre arasında nitelik yönünden değil, daha çok nicelik yönünden fark vardır. antineoplastik ilaçlar vücutta patolojik biçimde çoğalmakta olan kanser hücrelerini yok ettikleri gibi, hızlı biçimde çoğalmakta olan normal hücreleri de yok ederler (Üstündağ, 2013).

Kanser tedavisi vücutta tek bir kötü huylu tümörlü hücresi kalmaksızın tümünün yok edilmesi ile mümkündür. Ancak günümüzde böyle bir durum bazı istisnalar dışında varolan ilaçlarla sağlanamamaktadır. Antineoplastik ilacın terapötik etkinliğini kısıtlayan başka bir faktör, tümör hücrelerinin ilaca karşı azalmış hassasiyeti ve ilaca karşı direnç gelişimidir (Gate ve Tew, 2001).

Kemoterapide kullanılan bu ilaçlar, yapı ve etki mekanizmaları bakımından farklı olduklarından ilaçların birbirleri ile kombine edilerek uygulanması, hücrelerin daha iyi bir şekilde kontrol altına alınmasını ve hastalarda daha az oranda yan etkilerin görülmesini sağlamaktadır (Can 2005).

Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlarla birlikte çeşitli bitkisel kaynaklı fenolik bileşiklerin de tedaviye eklenmesi antikanser etkinin artırılmasında ve sitotoksisitenin azaltılmasında önemli bir çalışma alanıdır (Becit, 2017) (Şekil.3.4). Bunun yanı sıra kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ilaçların birçok yan etkisi de vardır. Bu yan etkilerin çoğu ilacın kendi toksisitesi ile ilişkili olsa da ilaç etkileşimleri de bu yan etkilerin azalması veya şiddetlenmesine neden olabilir.



Şekil 3.4 Kemoterapötik ilaçların sınıflandırılması

3.3. Antineoplastik İlaçlar

Antineoplastik ilaçlar vücutta hızla çoğalmakta olan kanser hücrelerinin yayılmasını, büyümesini önleyerek veya bunları parçalayarak yok edebilirler. Ancak

malign hücreler yanında normal hücreleri de yok edebilirler. Antineoplastikler, hücre siklusuna etkilerine, kimyasal yapılarına, orijinlerine ve etki mekanizmalarına göre sınıflandırılmaktadırlar (Türk 2016) (Şekil 3.4.).

Grup	İlaç ismi	Hücre siklusuna bağımlılığı?
Antimetabolitler		
Folat antagonistleri	Metotreksat	Evet
Pirimidin analogları	5-Fluorourasil, Gemsitabin, Sitarabin	Evet
Pürin analogları	Azasitidin, Azatiyoprin, Fludarabin, Kladrinin, 6-Merkaptopürin, Tiyoguanin	Evet
Sitotoksik antibiyotikler		
Antrasiklinler	Daunorubisin, Doksorubisin, Epirubisin, İdarubisin, Plikamisin	Hayır
Diğerleri	Daktinomisin, Mitomisin, Bleomisin	Hayır Evet
Alkilleyiciler ve benzer etki gösterenler		
Nitrojen mustardlar	İfosfamid, Klorambusil, Melfalan, Mekloreタミン, Siklofosfamid	Hayır
Nitrozürelere	Karmustin, Lomustin	Hayır
Platin bileşikler	Karboplatin, Sisplatin	Hayır
Diğerleri	Busulfan, Dakarbazin, Prokarbazin	Hayır
Mikrotübül inhibitörleri		
Vinka alkaloidleri	Vinblastin, Vindesin, Vinkristin, Vinorelbin	Evet
Diğerleri	Dosetaksel, Paklitaksel	Evet
Diğer kemoterapötikler		
	Etoposid, Teniposid, L-asparajinaz	Evet
	Anti-androjenler, Anti-östrojenler, Glukokortikoidler, Östrojenler	Hayır
	Imatinib, Sitokinler	Hayır

Şekil 3.5 Antineoplastiklerin sınıflandırılması (Türk, 2013).

Antineoplastiklerin Etki Mekanizmaları

Kemoterapide kullanılan antineoplastik ilaçlar hücre siklus fazına bağlı ya da değildirler. Hücre siklusuna bağlı ilaçlar, çoğalmakta olan hücrelere etki ederler. Hücre siklusuna bağlı olmayan ilaçlar ise aktif hücre siklusunun tüm fazlarına etkirler (Türk, 2016).

- Hücre Döngüsüne Spesifik Ajanlar

Kanser hücreleri hücre döngüsünü düzenleyen sinyalleri dinlemezler. Hücre siklusu kontrol noktalarında değişimler kanser gelişimine neden olabilir. Kanser gelişiminde tümör baskılayıcı fonksiyon, DNA onarımı ve apoptozis kritik yolaklardır (Cabadak, 2008).

Hücre döngüsüne spesifik ajanlar DNA sentezini ya da hücre bölünmesini önlenmektedirler. Siklus fazına spesifik ajanlar: Siklusun belli fazlarına etkilidirler (Türk,2016).

Hücre siklusunda 3 temel kontrol noktası; G -S geçişinde, G -M geçişinde ve metafaz-anafaz geçişinde bulunmaktadır.

Eğer hücre G1 kontrol noktasında “devam et” sinyalini alırsa, genellikle G1, S, G2, ve M fazlarını tamamlar ve bölünür. Eğer hücre “devam et” sinyalini almazsa, döngüden çıkar ve G0 fazı adı verilen bölünmeme durumuna geçer (Cabadak, 2008 ; Reece vd., 2013) (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 Hücre Döngüsü

G₁ fazı: Siklusun başlangıç fazıdır. DNA sentezi için gereken RNA ve proteinler gibi prekürsörlerin sentezlendiği aşamadır. Örneğin kortikosteroidler bu faza etkir.

S fazı: DNA sentezinin gerçekleştiği fazdır. DNA replikasyonu, kromozom çiftlenmesi, RNA sentezi ve takiben protein sentezi gerçekleşir. DNA sentez inhibitörlerinin etkidiği fazdır. Antimetabolitler, bleomisin (G₂ fazına da etkir), hidroksiüre, prokarbazin bu faza etkir.

G₂ fazı: Mitoza hazırlık fazıdır. Bu nedenle DNA sentezi dururken mitoz için gerekli RNA ve protein sentezi devam eder. Örneğin bleomisin ve topoizomeraz 1 inhibitörleri bu faza etkir.

M fazı: Mitoz ve hücre bölünmesinin gerçekleştiği fazdır. Bu nedenle prekürsör sentezi için gerekli protein ve RNA sentezi durur. Mitoz gerçekleşir. 4 safhada 2 yeni hücre oluşur. Örneğin taksanlar, vinka alkaloidleri gibi ilaçlar bu faza etkir.

G₀ fazı: Bölünmeme durumunun olduğu istirahat fazıdır. Hücreler genellikle antineoplastiklere dirençlidir. İlacın dozunun artırılması etkiyi arttırmaz, ancak ilaç verilme süresinin uzatılması etkiyi artırır. Hızlı gelişen kanserler, örneğin hematolojik kanserlerin tedavisinde etkilidirler (Türk, 2016).

- Hücre Döngüsüne Bağlı Olmayan Ajanlar

Alkilleyici ajanlar (CP) ve anti tümör antibiyotikler (bleomisin hariç) bu gruba girerler. İlaç dozunun artırılması etkinliğini arttırabilir (Türk, 2016). Tüm antineoplastik ilaçlardan en gonadotoksik olanlar alkilleyici ajanlar, antimetabolitler, vinka alkaloidleri ve sınıflandırılmayanlar olarak bilinmektedir (Can 2005; Gültekin 2013).

3.3.1. Alkilleyici Ajanlar

Kanser tedavilerinde kullanılan en önemli ilaç gruplarından birisi olan alkilleyici ajanlar; amino, karboksil, sülfidril ve fosfat gruplarına kovalent bağlanarak hücre fonksiyonlarını bozarlar ve fizyolojik şartlar altında hücreye en sık bağlandıkları kısımlar DNA, RNA ve protein kısımlarıdır (Limandal 2013). Sıklıkla proteinlerde amino gruplarını (NH₂) alkilleyerek etki ederler (Kayaalp, 1998). Reaktif elektrofil olabilmeleri sayesinde hedef moleküller ile karbonyum iyonu oluştururlar ve bunun sonucunda da bu kimyasal ajanlar, hücresel DNA ile kompleks oluşturarak kanserli hücrelerin büyümelerini inhibe ederler (Atasoy, 2016). Alkillenmenin en sık olduğu bölge 7 pozisyonundaki guanindir. Böylece buradan oluşan mRNA hatalı kodlanır. Dolayısı ile oluşan DNA sarmalı patolojik olur (Kayaalp, 1998). Alkilleyici ajanların ortak yan etkisi kemik iliğini süprese

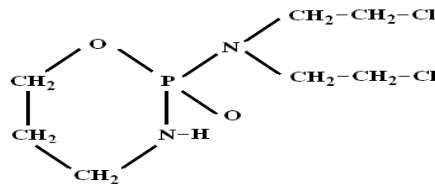
etmeleridir. Uzun dönem kullanımlarında gonadotoksik etkileri oluşabilir ve sekonder lösemiye sebep olabilirler (Türk, 2016). CP, ifosfamid, dakarbazin, sisplatin, klorambusil, melfalan, mekloremin, karboplatin, busulfan, lomustin ve prokarbazin gibi ilaçlar bu gruba örnek olarak verilebilir (Atal 2014).

Hücre döngüsünden bağımsız olan alkilleyici ilaçlar, kemik iliği ve lenfoid dokuda baskılanmaya yol açarlar. Lenfoid dokuyu etkilemeleri, immünoşüpresif etkinliğin temelini oluşturmaktadır (Türk, 2016).

CP, ifosfamid ve dakarbazin farmakokinetik anlamda ön ilaçtır. Karaciğerde karma fonksiyonlu sitokrom oksidaz sistemi tarafından aktif metabolitlere dönüştürülürler. Bu metabolitler kanserli hücrelerde reaktif metabolitlere dönüşür (Türker ve Dizdar 2005).

3.3.1.1. Siklofosfamid (CP)

Alkilleyici ilaçlar kanser tedavisinde çok uzun bir süreden beri kullanılan ve en sık başvurulan tipte ilaçlardır. Alkilleyici ilaçlar arasında en çok kullanılan ilaçlardan birisi olan CP, nitrojen mustrad grubundan antikanser bir ilaçtır. 1940'lı yıllarda zehirli gaz olarak Birinci Dünya Savaşı sırasında kullanmak amacıyla 100 ton Mustard gazı taşıyan geminin batması sonucu Dr. Alexander tarafından (1943) yapılan araştırmalarda bu gaza maruz kalan askerlerde lökopeni saptanmıştır. Daha sonraki yıllarda azotlu hardal (nitrojen mustard) bileşiklerinin hem geliştirilmesine hem de deney hayvanlarındaki tümörlerde denenmesine yol açmıştır. Bu incelemeler sonunda modern kanser kemoterapisi çağı başlamıştır (Ray vd., 2010). CP' nin kimyasal yapısı şekil 3.7 ve moleküler yapısı çizelge 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.7 Siklofosfamid; 2-bis (kloroetil) amino tetrahidro-2H-1,2,3-oksazofosforin 2 oksit (Gilman vd., 1985).

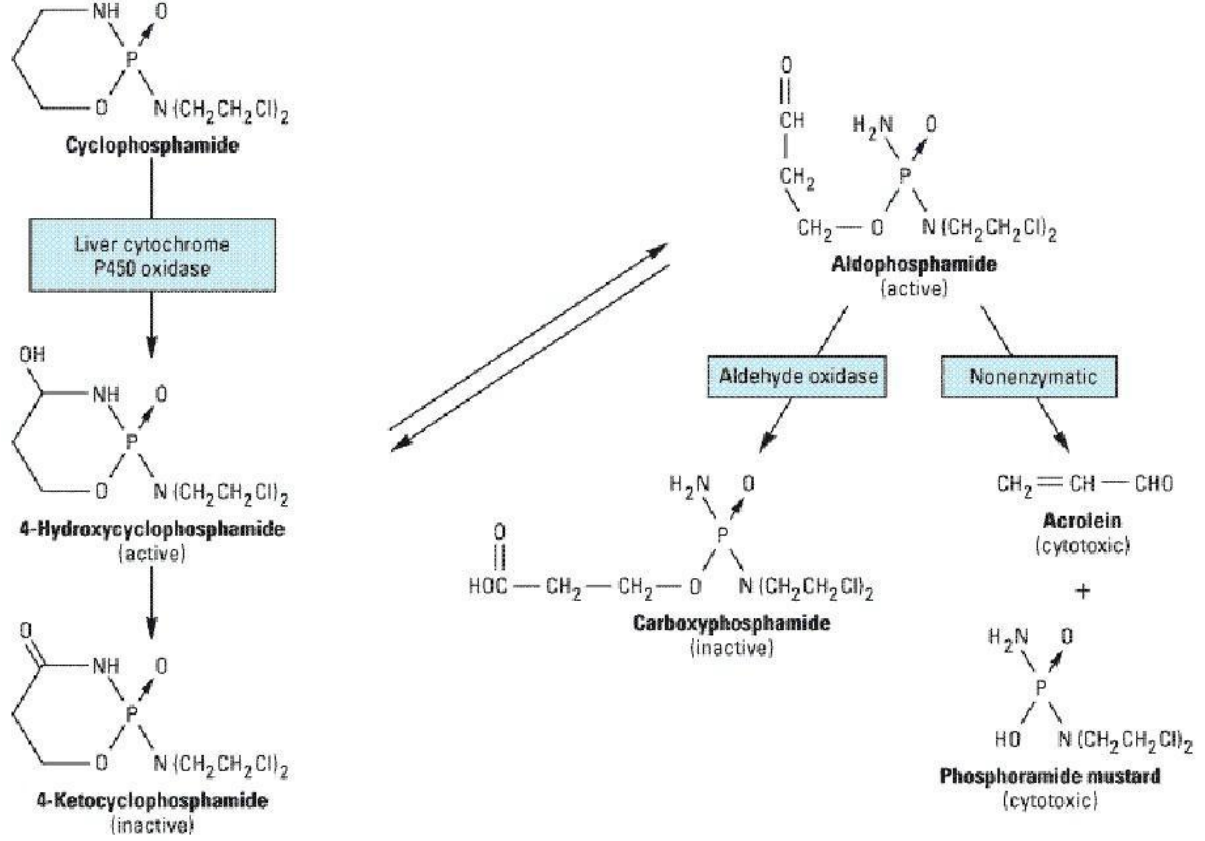
Antineoplastik kemoterapötik bir ilaç olan CP, çocukluk ve yetişkin malignansilerinde, sistemik lupus eritematoz, multiple skleroz gibi hastalıklarda sıkça kullanılan bir ilaçtır (Limandal 2013). CP'nin aktif metabolitleri FAM ve ACR'dir. Bunlar çok hızlı çoğalan dokulara müdahale eder ve DNA dizilerinin çapraz bağlanmasına sebep olarak hidrojen peroksit (H_2O_2) üretimi üzerinden oksidatif DNA hasarına neden olurlar (Atasoy, 2016).

Çizelge 3.2 Siklofosfamidin(CP) fiziksel ve kimyasal özellikleri

Moleküler Formülü	$C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$
Moleküler Ağırlık	261.09
Fiziksel Özellikleri	Kokusuz, ince beyaz kristal toz
Erime noktası	49.5 – 53 ° C
Kaynama noktası	336° C
Yoğunluk	1.479 g/cm ³
Çözünürlük	Kloroform, dioksan ve glikoller içinde çözünür, benzen, karbon tetraklorürde hafifçe çözünür, eter ve asetonda çok az çözünür.
Bölüm katsayısı	0.63
pKa	4.5-6.5
Stabilite	30°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda klor atomlarının ayrışmasıyla hidroliz meydana gelir. Oksidasyon, nem ve ışığa duyarlıdır.

Siklofosfamidin kanserostatik aktivitesi hepatik mikrozomal karma fonksiyon oksidaz sistemi ile oluşan FAM metabolizmasına bağlıdır (Bernacki vd., 1987) (Şekil 3.8). P-450 monooksijenaz sisteminin etkisi altında siklofosfamid, 4-hidroksi siklofosfamide metabolize olur. Bu metabolit de enzimatik olmayan bir yolla dönüşür. Aldofosfamid de FAM ve ACR'ye ayrılır. ACR doku antioksidan savunma sistemine müdahale ederek yüksek oranda ROS oluşumuna yol açar (Kawabata vd., 1990; Masuda vd., 2006) ve son yıllardaki araştırmalar, CP'nin oksidatif metabolizması sırasında süperoksit anyonu, H_2O_2

ve hidroksil radikali gibi ROS'ları ürettiği ve karaciğerdeki antioksidan savunma mekanizmalarını bastırıldığını ileri sürmektedir (Shorkrzadeh vd.,2014).



Şekil 3.8 Siklofosfamid metabolizması (Gilman vd., 1985).

2.3.1.2. Siklofosfamid (CP)'in Testiküler Toksisitesi

CP, pek çok kanser türünde en çok kullanılan ve en etkili bir ilaç olmasına rağmen insanda fiziksel ve sosyal birçok yan etkilere neden olmaktadır. Diğer kemoterapötikler gibi sosyal yan etkilerinin yanı sıra infertilite hem erkek hem de kadınlarda meydana getirdiği en önemli yan etkilerden biridir. Cinsel isteksizlik, testiküler yapıdaki değişiklikler, spermatogenezdeki bozukluklar, gonadotropin düzeylerindeki değişiklikler, sperm DNA ve kromozomlarındaki hasarlar kemoterapi kaynaklı yan etkilerden bazılarıdır (Türk, 2013).

Son yıllarda çocukluk çağı kanserlerinin çoğunda sağkalım oranları, çarpıcı bir şekilde artmış olup, kemoterapi bu hastaların çoğunun tedavisinde temel bir dayanaktır. İdeal olarak, kemoterapötik ajanlar sağlıklı dokuları etkilemeden kanserli hücreleri spesifik olarak hedef alır, ancak pratikte gonadlar da dahil olmak üzere sitotoksik tedavilerin hedef dışı etkileri vardır (Smart, 2018). Kemoterapötik ajanların gonadal toksisiteye neden olmasının en temel sebebi, gonadal hücrelerin yüksek mitotik aktiviteye sahip olmalarıdır. Özellikle hematolojik malignitelerin tedavisinde sık kullanılan bazı kemoterapötik ajanlardan gonadlar, hem endokrin hem üreme fonksiyonu açısından ciddi oranda etkilenir. Kemoterapötiklerin germ hücrelerinde mutasyonlara, gonadotropin hormonunda kayıplara ve fetüste teratojen etkilere yol açabildiği gözlemlenmiştir (Browne, 2008). Spermatogenezdeki bozukluklar, istenilmeyen sperm kalitesi, ejakülasyon bozukluğu, cinsel fonksiyon bozukluğu gibi olumsuz durumlar kanser ilaçlarının üreme sistemindeki yan etkilerinden bazılarıdır. Testislerdeki Sertoli ve Leydig hücreleri, kanser ilaçlarına karşı kısmen dirençli iken; germinal epitel ise bu ilaçların zararlı etkilerine karşı oldukça duyarlıdır (Ragheb ve Sabanegh 2010).

Gonadal toksisitesi ön planda olan en önemli kemoterapötik ajanlar alkilleyicilerdir. Farklı kemoterapötik ajanların kombine kullanımları da değişen oranlarda gonadal disfonksiyon yapabilirken, siklofosfamid tek başına verildiğinde dahi hem kadın hem erkekte ciddi gonadal disfonksiyon yapabilir (Türk 2016). CP, sisplatin ve doksorubisin gibi en yaygın olarak kullanılan kemoterapi ilaçlarının prepubertal fare testisi üzerindeki etkileri incelendiğinde spermatogonial kök hücreler de dahil olmak üzere germ hücrelerinin spesifik ve oldukça önemli bir kaybına yol açtığı tespit edilmiştir (Smart, 2018).

Evli çiftler kanser ilaçlarından kaynaklanan infertiliteden %15 etkilenmektedir. Erkeğe bağlı infertilite ise bu oranın yarısını oluşturmaktadır (Sharlip vd., 2002). İnfertilite ve hipogonadizm, yaşam kalitesini önemli derecede etkileyebilecek etkilerden muzdarip kanserli hasta popülasyonu günden güne artmaktadır. Prepubertal erkekler için mevcut doğurganlık koruma yöntemlerinin bulunmaması nedeniyle durum, erkek çocukluk kanseri hastaları için özellikle endişe vericidir (Smart, 2018).

3.4.Kemoterapi Sürecinde Serbest Radikaller

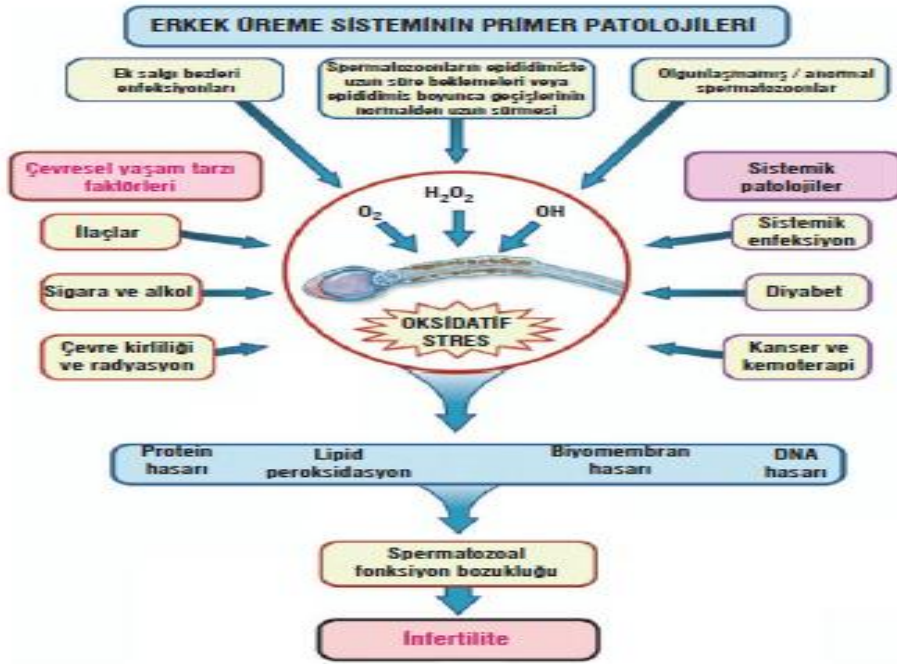
Biyomoleküllerin yapısını oksidatif olarak değiştirebilme kapasitesine sahip, son yörüngelerinde birden fazla eşlenmemiş elektron bulunduran, atom veya moleküller “serbest radikaller” olarak adlandırılmaktadır (Türk, 2013). Sayılan özelliklerinden dolayı kararsız yapıdadırlar. Kararlı duruma geçmek için diğer maddelerle reaksiyona girerler. Serbest radikaller oksijen ve nitrojen kaynaklı olabilir. Bunlardan oksijen kaynaklı olanlar; süperoksit ($O_2\cdot$), singlet oksijen ($1O_2$), lipid peroksil, hidroksil ($OH\cdot$), H_2O_2 ve alkoksil radikalleri sayılabilir. Nitrojen kaynaklı türleri ise nitrik oksit ($NO\cdot$) ve nitrojen dioksit ($NO_2\cdot$) oluşturur. Serbest radikaller endojen ve eksojen kaynaklı olabilir. Endojen kaynaklıların en önemli üretim yeri mitokondridir. Eksojen kaynakları ise UV ışınlar ve çeşitli kimyasal maddelerdir.

Hücre içerisinde serbest radikaller belli bir seviyede olmalıdır. ROS seviyelerinin artması canlı organizmada yapısal bozukluklara neden olarak oksidatif stres durumunu ortaya çıkarır. Oksidatif stres, hücresel bileşenlerde başta kanser olmak üzere, yaşlanma, kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli patolojik durumların başlamasına ve ilerlemesine neden olmaktadır (Karabulut ve Gülay, 2016; Becit, 2017). SOR hem zararlı (toksik) hem de yararlı etkiler sağlamak açısından ikili bir rol oynamaktadır. Önemli olan bu zıt etkiler arasındaki hassas dengenin ayarlanmasıdır. SOR’un düşük konsantrasyonları hücrelerde enfeksiyöz ajanlara karşı korumada, sinyal iletim yollarını biçimlendirmede ve mitojenik uyarılara karşı yanıtın başlatılmasında, protein tirozin fosforilasyonunu artırarak spermilerin olgunlaşması, akrozom reaksiyonu, hiperaktivasyonu ve sperm-oosit füzyonu gibi olayların düzenlenmesinde etkilidir (Çiftçi, 2017; Türk, 2013).

Öte yandan hidroksil radikali ve peroksinitrit özellikle hücre membranlarına ve lipoproteinlere zarar verir. Sitotoksik ve mutajenik olan malondialdehit (MDA)’in oluşumuna neden olan kimyasal zincir reaksiyonlarını başlatır. Oksidatif hasar sonucu oluşan MDA, DNA yapısındaki bazlarla reaksiyona girer ve mutajenik etki gösterir. Hidroksilin DNA ile etkileşmesi kimyasal karsinogenezde önemli rol oynar. Genetik mutasyonlara neden olabildiği gibi gen transkripsiyonunu değiştir. Nötralize edilemeyen

SOR ile başlayıp, kontrol edilemeyen hücresel ve moleküler değişikliklere kadar ilerleyen süreç kanser gibi ciddi hastalıkların gelişiminde büyük rol oynar (Çiftçi, 2017).

Kemoterapi, kanda serbest radikal tutucu kapasiteyi azaltmakta, lipid peroksidasyon ürünlerini artırmakta ve bazı plazma antioksidan vitaminlerinin düzeylerinde azalma göstermektedir (Sabuncuoğlu ve Özgüneş, 2011). Kemoterapötiklerden biri olan CP, MDA seviyesinde artışa neden olurken, glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz, CAT gibi enzimlerde ise azalmaya neden olarak hayati organlarda oksidatif hasarlar oluşturmaktadır (Wei vd., 2011). Spermatogenik hücrelerde doğrudan veya dolaylı olarak oksidatif stresle ilişkili kromatin ve DNA hasarı meydana getirdiği bilinmektedir (Türk, 2013). (Şekil 3.9)



Şekil 3.9 Oksidatif strese yol açan erkek üreme sisteminin primer patolojileri

Sitotoksik etkilerini serbest radikaller oluşturarak gösteren ajanlar (alkilleyici ajanlar, radyasyon gibi) kemoterapi ile birlikte antioksidan takviyesi olması gerektiğini göstermiştir (Sabuncuoğlu ve Özgüneş, 2011). Güncel çalışmalara bakıldığında çeşitli bitkisel kaynaklı fenolik bileşikler kullanılarak antikanser etkinin artırılması, sitotoksitenin azaltılması amaçlanmakta ve araştırılmaktadır.

Son yıllarda yapılan çalışmalar antioksidan özellikteki koruyucu bileşiklerin kullanımı ile oksidatif stres'den kaynaklanan hastalıkların gelişiminin engellenebileceği ya da geciktirilebileceğini göstermiştir (Becit, 2017).

3.5.Kemoterapi Sürecinde Antioksidan Savunma Sistemi

Antioksidanlar dolaylı ve doğrudan ilaçların oksidasyonuna karşı koyan, oksijen ya da peroksitlerle ilerleyen reaksiyonları engelleyen, kanser yapıcıların sitotoksik etkilerine karşı hücreleri savunan maddelerdir (Can, 2014).

Oksidatif stres ile oluşan SOR'un detoksifikasyonu için antioksidan enzimler veya enzimatik olmayan moleküller devreye girer. Bunlar doğal olarak vücutta üretilir veya gıdalar yoluyla tedarik edilir. Antioksidan enzimler, CAT, GPx, süperoksit dismutaz (SOD) ve glutasyon redüktaz (GRx)'dır. Bunlar SOR'un nötralize edilmesinde doğrudan etkilidir. Enzimatik olmayan antioksidanlar ise süpürücü antioksidanlar, sentetik antioksidanlar ve koruyucu antioksidanlar olarak ayrılır. Bunlara örnek olarak Q-10, lipoik asit, bilirubin glutasyon, L-arjinin, melatonin, ürik asit, metal-bağlayıcı proteinler, transferrin verilebilir. E ve C vitaminleri, karotenoidler, iz elementler (selenyum, manganez, çinko), flavonoidler, omega-3 ve omega-6 yağ asitleri besinsel antioksidanlardır. Bu besinsel antioksidanlar vücutta üretilemedikleri için gıdalar veya takviyeler ile edinilir. Antioksidanlar sayesinde SOR'un vereceği olası hasarlar engellenebildiği gibi oluşan hasarın onarılması da sağlanabilir. Böylece immün sistem savunmasını artırabilir ve kanser gibi hastalıkları engellemek mümkün hale gelebilir (Çiftçi, 2017) (şekil 3.10).



Şekil 3.10 Antioksidan savunma sistemleri (Efdal, 2014)

CP ve metabolitlerinin neden olduğu yan etkileri engellemek için vücut, doğal ve elzem antioksidanlarıyla antioksidatif savunmasını artırır. Bu nedenle kemoterapinin neden olduğu toksisiteden sağlıklı doku ve hücreleri korumak için güçlü ajanlara ihtiyaç vardır. Çeşitli araştırmalar, kemoterapi sırasında antioksidan girişinin kemoterapiye bağlı meydana gelen reaksiyonların kontrol altına alınabileceğini ve antineoplastik ilaçların yan etkilerinin minimize edilebileceğini göstermiştir (Efdal, 2014).

Sağlıklı beslenme hastalıklardan korunmak için çok önemlidir. Özellikle serbest radikallerin etkisinden kurtulmak için antioksidan beslenme önemlidir. Besin antioksidanları, insanlarda fizyolojik şartlarda oluşan serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu olumsuz etkilerin bir kısmını ya da tamamını etkisiz hale getirebilen maddeler olarak tanımlanabilir (Arı vd., 2017).

3.5.1. *Hipericum triquetrifolium* Turra ve Antioksidan Etkisi

Hipericum türlerinin yaygınlık göstermesi açısından, ülkemiz önemli bir gen merkezidir (İbadova, 2006). *Hipericum*, *Clusiaceae* (*Guttiferae*, *Hypericaceae*) tıbbi özelliklere sahip otsu bitkidir ve fitoterapide yaygın olarak kullanılmaktadır (Robson, 2006). Bu familyanın en çok bilinen türü *Hypericaceae*' dir ve 1000'den fazla tür içermektedir. Dünyanın birçok bölgesinde yaygın olarak bulunur. Türkiyede ise bu familyaya ait 80' e yakın türü bulunan tek cins *Hipericum* ' dur (Potoğlu-Erkara ve Tokur, 2004)

Türkiye' de kantaron, kantarum, koyun kıran ve bin bir delik otu adlarıyla bilinir (Baytop, 1984). Eski zamanlardan beri şeytanı ve kötü ruhları kovduğuna inanılan *Hipericum*'un cins adı Yunanca kökenli olup ‘‘hayalet ve kötü ruhları uzaklaştıran’’ anlamına gelmektedir. Tıbbi açıdan, oldukça yaygın kullanım alanlarına sahiptir (Toker, 2002). Ayrıca *Hipericum*, Hıristiyan azizlerinden biri olan St. John's ile ilişkilendirilmiştir. *Hipericum*'un çiçeklenmeye başladığı 21-24 Haziran döneminde St. John'un doğduğuna, *Hipericum*'un yapraklarında kırmızı beneklerin belirginleştiği Ağustos döneminde ise St. John'un öldürüldüğüne bu nedenle de bitkinin kanadığına inanılırdı. ‘‘ St. John's Wort’’

olarak adlandırılan bu bitki “St.John günü” adı verilen özel günlerde toplanmaktadır (Baytop, 1984).

Hipericum türünün ortak bir özelliği bitkinin yaprak ile sapı arasında karşılıklı dizilmiş olarak yer alan tomurcuk yaprakların olmasıdır. Yapraklar sıklıkla siyah veya kırmızı renkte salgı yapan noktacıklar içerir. Çiçek, 5 parçalı yeşil renkte çanak yaprağa ve sarı renkte taç yaprağa sahiptir. Meyveleri iki veya daha fazla karpelden yapılmıştır, birçok küçük silindirik tohumlar içerir (Baytop, 1991; Robson, 2003). Yapraklardan ve çiçeklerden yapılan boyar madde sebebiyle boya sanayisinde kullanımı oldukça önemlidir (İbadova,2006).

Hipericum türleri, antioksidan özelliklere sahip çok sayıda biyoaktif bileşik içermektedir (Patocka, 2003). Genel olarak bunların başlıcaları; tanenler, esansiyel yağlar (Bertoli vd., 2003), flavonoidler, terpenoidler ve fenolik bileşiklerdir. Biyolojik özelliklerinin geniş yelpazeye sahip olmasını *Hypericum* türlerinin içerisindeki hiperisin ve hiperforin gibi etken maddelerden kaynaklandığı belirlenmiştir. Bunlara ek olarak son yıllarda yapılan çalışmalar *Hipericum* türlerin pseudohiperisin ve protohiperisin gibi bileşenlere sahip olduğunu göstermiştir (Karaoğlu, 2014).

Hipericum türleri, yapısında bulundurdukları etken maddelerden (flavonoidler, uçucu yağlar v.b) dolayı *Hipericumun* antidepresan aktivitelerine önemli katkı sağlamaktadır Antidepresan yönüyle önemli bir etkiye sahip olan bu bileşik hastalar için öfori verici ve antidepresif olarak çeşitli preparatlarda kullanılır. Hiperisinin fotodinamik özelliği birçok kanser türünün tedavisinde kullanılmaktadır. Aynı zamanda bitki zeytinyağında bekletilerek sinir yatıştırıcı olarak kullanılmaktadır. Böbrek taşlarını düşürmekte, şeker hastalığında, astım ve ülser gibi mide hastalıklarında ve antibiyotik özelliğinden dolayı yara ve yanık iyileştirilmesinde kullanımı önemlidir (İbadova, 2006).

Hipericum cinsinin birçok türü bazı bakteriyal hastalıklarının, mide ve bağırsak iltihaplarının tedavisinde Türk halk ilacı olarak kullanılır (Sakar vd.,1988).

Klinik çalışmaların sonuçları ve diyet bileşenleri olarak ciddi bir ilgi uyandırmış olan flavonoidlerin çeşitli kanser türlerinde ve kardiyovasküler hastalıkların önlenmesinde

olası rolünün olduğunu göstermiştir (Chu, 2000). Bu sebeplerle *Hipericum* türlerinin birçok grubunda fenoliklerin varlığı incelenmiştir (Cırak vd., 2008).

Son yıllarda *Hipericum triquetrifolium* Turra (Guttiferae) bilimsel dikkatleri üzerine çeken bir bitki olup, fenoliklerin de dahil olduğu çok sayıda biyoaktif bileşen içermektedir (Cırak, 2011). *Hipericum triquetrifolium*'Turra'nın Türkiye'de yayılış gösterdiği bölgeler: Marmara, Ege, Doğu Anadolu ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleridir (Robson, 1975). *Hipericum triquetrifolium* Turra daha önce klorojenik asit, rutin, hiperosit, quersitrin, quersetin (Pistelli vd., 2005), kamferol (Conforti vd., 2002), fenolik ve flavonoid bileşikler (Toker, 2009) içerdiği rapor edilmiştir. Polifenolik bileşenlerin biyolojik etkilerine büyüyen bir ilgi vardır; özellikle bitki flavonoidlerinin alınması çeşitli hayvan modellerinde antikarsinogenik (Cassady vd., 1990) ve kardiyovasküler hastalıklara zıt (Hertog vd., 1993) etkiler göstermektedirler. Bununla birlikte *Hipericum triquetrifolium* Turra' daki fenol bileşenlerinin çeşitleri üzerine az sayıda çalışma yapılmıştır. *H. triquetrifolium* İtalya ve Türkiye'nin çeşitli yerlerinde sedatif ve antiseptik etkileriyle geleneksel olarak kullanılmaktadır (Baytop, 1984). Literatürde *Hipericum triquetrifolium* Turra için antioksidan, antiviral, antimikrobiyal ve antinosiseptif aktiviteler rapor edilmiştir (Apaydin vd., 1999; Tawaha vd., 2007; Couladis vd., 2002). Son zamanlardaki çalışmaların sonuçları *Hipericum. triquetrifolium* Turra'nın antinosiseptif (Apaydin vd., 1999), anti-inflamatuvar (Öztürk vd., 2002), antioksidan (Conforti vd., 2002) aktiviteleri ile tıbbi bir ilaç olarak kullanılabileceğini rapor etmiştir.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

Tez çalışmamızın deneysel kısmı; Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü; Hayvan Fizyolojisi Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmamız Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulunun 2016 tarihli ve 531-2 sayılı kararı ile kabul edilmiştir. Karar örneği ektedir.

4.1. Deney Hayvanları

Deneysel çalışmamızda Wistar albino erkek sıçanlar arasından rastgele seçimle, sağlıklı, 200 ± 20 g ağırlıkta, yaklaşık 3 aylık, her birinde $n=7$ 'şer sıçan olmak üzere toplam 9 grupta 63 adet sıçan kullanıldı. Tüm deney hayvanları T.C. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezi (TİCAM)'nden temin edildi. Deney hayvanlarının laboratuvar ortamına 1 hafta süre ile adaptasyonları sağlandı. Deney hayvanları deney süresince 12:12 aydınlık/ karanlık ışıklandırması olan, ısı (22 ± 2 °C) ve nemi (%45- 50) otomatik olarak ayarlanmış odalarda yaşatıldı. Deney sürecinde tüm sıçanlar polikarbonat şeffaf kafeslerde tutuldu ve standart pellet sıçan yemi ile beslendi ve çeşme suyu verildi.

4.2. Deney Grupları

Grup 1 (Kontrol Grubu): Sıçanlara 6 gün boyunca 0.5 ml serum fizyolojik (SF) enjeksiyonu yapıldı. 7. gün tüm hayvanlar saksifiye edildi.

Grup 2 (150 mg/kg CP Grubu): Sıçanlara 5 gün boyunca 0.5 ml SF enjeksiyonu yapılarak deneyin 6. gününde tek doz 150 mg/kg CP + 0.5 ml SF enjeksiyonu yapıldı. 7. gün tüm hayvanlar saksifiye edildi.

Grup 3 (25 µg/ml HT Grubu): Sıçanlara 6 gün boyunca 25 µg/ml HT ekstresi + 0.5 ml SF enjeksiyonu yapıldı. 7. gün tüm hayvanlar saksifiye edildi.

Grup 4 (50 µg/ml HT Grubu): Sıçanlara 6 gün boyunca 50 µg/ml HT ekstresi + 0.5 ml SF enjeksiyonu yapıldı. 7. gün tüm hayvanlar saksifiye edildi.

Grup 5 (100 µg/ml HT Grubu): Sıçanlara 6 gün boyunca 100 µg/ml HT ekstresi + 0.5 ml SF enjeksiyonu yapıldı. 7. gün tüm hayvanlar saksifiye edildi.

Grup 6 (150 mg/kg CP + 25 µg/ml HT Grubu): Sıçanlara 5 gün boyunca 25 µg/ml HT ekstre enjeksiyonu yapılarak deneyin 6. gününde 150 mg/kg CP enjeksiyonu yapıldı. 7. gün tüm hayvanlar saksifiye edildi.

Grup 7 (150 mg/kg CP + 50 µg/ml HT Grubu): Sıçanlara 5 gün boyunca 50 µg/ml HT ekstre enjeksiyonu yapılarak deneyin 6. gününde 150 mg/kg CP enjeksiyonu yapıldı. 7. gün tüm hayvanlar saksifiye edildi.

Grup 8 (150 mg/kg CP + 100 µg/ml HT Grubu): Sıçanlara 5 gün boyunca 100 µg/ml HT ekstre enjeksiyonu yapılarak deneyin 6. gününde 150 mg/kg CP enjeksiyonu yapıldı. 7. gün tüm hayvanlar saksifiye edildi.

Grup 9 (DMSO Grubu): Sıçanlara 6 gün boyunca 10 ml % 0,2 DMSO grubu enjeksiyonu yapıldı. 7. gün tüm hayvanlar saksifiye edildi.

4.3. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan HT bitkisi tohum aşamasında Mayıs-Eylül dönemlerinde Mardin Zınnar Vadisi ve Bakırkırı mevkiiden Mardin Artuklu Üniversitesi Dr.Öğr.Üyesi Cumali Keskin tarafından teşhis edildi (2015/14) ve bitki örneklerinin topraküstü kısımları toplandı. Toplanan bitki örnekleri küçük parçalara ayrıldıktan sonra direkt ışık almayan ortamda oda sıcaklığında bir hafta süresince kurutuldu. Kurutulan bitki örnekleri toz haline gelinceye kadar öğütüldü. Öğütülmüş bitki kısımlarından 50 g alınıp metanolden oluşan çözücü serilerinde oda sıcaklığında, içerisinde 100 ml çözücü olacak şekilde çalkalayıcı su banyosunda bekletilerek 24 saat aralıklarla işlem 3 kez tekrarlandı. Çözünmeyen kısımlar filtre edilip süzütünün çözücüsü vakum altında evapore edildi. Tamamen çözücüsünden uzaklaştırmak amacıyla liyofilize edilen ham özüt, hemen ardından ultrasonik su banyosunda 10 mL % 0,2 DMSO (Dimetilsülfoksit) içerisinde çözülerek deneklere

uygulandı. Elde edilen HT metanol özütleri daha sonra değişik aşamalarda ihtiyaç halinde kullanılmak üzere derin dondurucuda (-20 C°) muhafaza edildi.

4.4. Kimyasal madde ve enjeksiyonlar

CP, (Sigma-Aldrich) ticari olarak temin edildi. CP'in uygulanan dozu güvenlik belgelerinde belirtilen oral LD₅₀ limitleri kapsamında düzenlendi. CP'in 500 mg'ı 25 ml bidistile suda çözülerek enjeksiyona hazır duruma getirilerek, steril tek kullanımlık enjektörlerle uygulandı. Kimyasal madde enjeksiyonları, çözeltilerin taze olarak hazırlanmasından sonra yapıldı. Bütün hayvanlar ilk enjeksiyondan ve öldürülmeden önce tartılarak ağırlıkları saptandı ve uygulanacak ilaç dozları belirlendi. Tüm enjeksiyonlar intraperitoneal (i.p.) olarak yapıldı. Kontrol grubundaki sıçanlara 0,5 ml SF verildi. CP (150 mg/kg) ile birlikte HT ekstresi verilen gruplarda ise HT ekstresinin verilmesine CP uygulamasından 5 gün önce başlandı ve deney süresince devam edildi. 6. gün sıçanlar tekrar tartılarak, CP dozları hesaplandı ve sıçanlara CP verildi. HT metanol özütü 10 ml % 0,2 DMSO içerisinde çözdürülerek verildi.

4.5. Sıçanlar Üzerindeki Cerrahi Uygulamalar ve Anestezi

Cerrahi işlemler, steril şartlarda cerrahi ekipmanlar kullanılarak 09.00 ile 12.00 saatleri arasında gerçekleştirildi. Bunun nedeni hormonal değişimlerin sıçanlar üzerine olası etkilerini minimuma indirmektir.(Assy, vd., 1998; Karabelyos, vd., 1999; 2002; Akino, vd., 2005) Ketamin/ksilazin (50/10 mg/kg) anestezisi ile tüm sıçanlardan 7. gün biyokimyasal analizler için intrakardiyak kan alımı yapıldı.

4.6. Kan örnekleri

Antikoagülsüz jelli biyokimya tüplerine alınan kan örnekleri Eppendorf Centrifuge 5804 R marka ve model cihaz ile 3000 devir/dakika' da 10 dakika santrifüj edilerek serum ve plazma elde edildi. Elde edilen serum örneklerinden GSH, CAT, SOD, TOS, TAS ve alınan plazma örneklerinden MDA saptandı ve OSİ değerleride TAS ve TOS miktarından hesaplandı.

4.6.1. Plazma Malondialdehit (MDA) düzeyinin belirlenmesi

Sıçanlardan alınan kan örneklerinin yarısı anti-koagülan içeren tüplere aktarıldı. Tüpler hafif çalkalandıktan sonra 5000 rpm de 10 dk santrifüj edilerek elde edilen plazma örnekleri biyokimyasal analizler yapılana kadar – 80 C^o de saklandı.

Plazma örneklerinde MDA miktarı TBARS (Tiobarbituric Acid Reactive Substance) yöntemi kullanılarak tayin edildi (Yagi, 1984). Lipid peroksidasyon ürünü olan MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile verdiği reaksiyon sonucu oluşan kırmızı-pembe renk spektrofotometrik olarak ölçüldü. Suda çözünür maddelerden bazıları TBA ile reaksiyona girerek aynı rengi verir. Bu maddeleri uzaklaştırmak amacıyla bir deney tüpüne 150 µL plazma, 1.2 mL sülfirik asit ve 150 mL fosfotungistik asit eklendi, iyice karıştırıldıktan sonra 5 dakika bekletildi. Karışım 1500 g' de 10 dk. santrifüj edildi. Serum lipitleri proteinle birlikte fosfotungistik asit/sülfirik asit sistemiyle çöktürüldü ve üst faz atıldı. Geriye kalan çökelek üzerine 2 mL saf su eklenip yeniden çözününceye kadar vortekslenildi. Tüpe 500 µL TBA eklendi ve 1 saat 100°C'de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından tüpler 1000 g'de 10 dakika santrifüjlendi. Üstteki berrak kısım alınarak 532 nm dalga boyunda absorbanslar okundu. 1 mmol 1,1,3,3-tetrametoksipropan 100 ml 0,01 M HCl içinde 50°C'de 1 saat inkübe edildi ve bu bileşiğin hidrolizi sonucu oluşan MDA çözeltisinden 10, 5, 3, 2, 1, 0,5 nmol/ml çalışma standartları hazırlandı. Elde edilen sonuçlarla standart grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanarak plazma MDA miktarı nmol MDA/ml olarak belirlendi.

4.6.2. Glutasyon (GSH) düzeyinin belirlenmesi

Serum GSH düzeyi, ticari kolorimetrik kit (Sigma-Aldrich/Türkiye) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda spektrofotometrik olarak ölçüldü (Glutathione Assay Kit CS0260-1KT). Örneklerin absorbansı 412 nm'de VERSA maxtunable mikro plaka okuyucu kullanılarak ölçüldü.

4.6.3. Süperoksitdismutaz (SOD) seviyesinin belirlenmesi

SOD seviyesinin ölçümü kolorimetrik assay kit (Cayman/USA) kullanılarak üretici firmanın önerilerine uyularak spektrofotometrik olarak belirlendi. Örneklerin absorbansı 405 nm’de VERSA maxtunable mikro plaka okuyucu (Kalifornia, ABD) kullanılarak ölçüldü. Sonuçlar U/mL SOD olarak tanımlandı.

4.6.4. Katalaz (CAT) seviyesinin belirlenmesi

CAT düzeyi kolorimetrik assay kit (Cayman/USA) kullanılarak üretici firmanın önerisi doğrultusunda spektrofotometrik olarak belirlendi. Örneklerin absorbansı 540 nm’de VERSA maxtunable mikro plaka okuyucu (Kalifornia, ABD) kullanılarak ölçüldü. Sonuçlar nmol/dak./mL olarak tanımlandı.

4.6.5. Total oksidan seviyenin (TOS) belirlenmesi

TOS ticari kolorimetrik assay kit kullanılarak ölçüldü. Örneklerin absorbansları VERSA max tunable microplate reader (Designed by molecular Divices in California, USA) kullanılarak 530 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. (Erel, 2005).

4.6.6. Total antioksidan seviyenin (TAS) belirlenmesi

TAS ticari kolorimetrik assay kit kullanılarak ölçüldü. Örneklerin absorbansları için 530 nm dalga boyunda VERSA max tunable microplate reader (Designed by molecular Divices in California, USA) kullanıldı. (Erel, 2004).

4.6.7. Oksidatif stres indeksinin (OSİ) hesaplanması

OSİ değeri TOS/TAS oranı baz alınarak hesaplandı. Hesaplama esnasında, TAS değerlerinin birimi, mmol Trolox equivalent/l cinsinden μmol Trolox equivalent/l cinsine dönüştürüldü. OSİ değeri, $[(\text{TOS}, \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ equivalent/l}) / (\text{TAS } \mu\text{mol Trolox equivalent/l}) \times 100]$ formülü kullanılarak hesaplandı (Aycicek vd., 2005).

4.7. Testis doku örneklerinin histolojik analizleri

4.7.1. Hematoksilin-eozin (H-E) Boyama

Cerrahi olarak çıkarılan testisler uç kısımlarından iğne ile dikkatlice delinerek %10'luk formaldehit içerisinde alındı. Daha sonra dilimlenerek formaldehitte bekletilmeye devam edildi. 18-24 saat sonra çeşme suyunda yıkandı. Artan derecelerdeki alkollerden geçirilerek dehidratasyon yapıldı. Sonra ksilol içine alınarak şeffaflaştırıldı. Sıvı parafinlerden geçirilerek bloklar elde edildi. Bloklardan 5 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Kesitler, hematoksilen ile 3 dakika muamele edilip distile sudan geçirilerek, 10 dakika eozin ile boyandı. Histolojik değerlendirmede seminifer tübüllerde hücre kaybı, hücrelerin birbiriyle bağlantı durumları, tübül lümeninin durumu, lümende dökülmüş hücrelerin varlığı, tübül bazal membranının durumu, interstisyel alanda Leydig hücrelerinin durumu, makrofaj ve diğer hücrelerin varlığı, ödem, kanama ve diğer göze çarpan özellikler değerlendirildi ve grupları temsil eden mikrofotograflar alındı.

4.7.2. İmmünohistokimyasal (Kaspaz 3, Bcl-2, Bax) Boyama

Bcl-2 ve Bax immünohistokimyasal incelenmesi için Anti-Bcl-2 antikor (ab7973)(Abcam) ve Anti-Bax antikor (ab7977) (Abcam) antikorları kullanıldı.

İmmünohistokimyasal inceleme için alınan testis doku örnekleri %10'luk formaldehit fiksasyonu sonrası 3 saat akan suda yıkandı. Alkol serilerinden geçirilen dokular parafin ile bloklandı. Poly-l-lysine ile kaplanmış lam üzerinde 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Deparafinizasyon işlemi için kesitler 60 C°'de etüvde 60 dakika parafinin erimesi için bekletildi. Kimyasal deparafinizasyon için lamlar ksilol serilerinden geçirildi. Daha sonra etil alkol serilerinden geçirildi ve boyama için hazır hale getirildi. Dokular yüksek basınç ve nemli ortamda 1/10'luk sitrat tamponu içinde 10 dakika tutuldu. Boyama kapalı kutu içinde nemli ortamda yapıldı. Solüsyonlar lam yüzeyindeki doku üzerini örtecek şekilde damlatıldı. Doku sınırlama kalemi ile çizilen dokular % 3'lük hidrojen peroksidadza 10 dakika bekletildi. Önce distile su ile 1 dakika sonra fosfat tamponu ile 2 defa yıkandıktan sonra Ultra V blokta 5 dakika bekletildi. Primer antikor (Bcl-2 (Anti-Bcl-2 antikor (ab7973)(Abcam)), Bax (Anti-Bax antikor (ab7977) (Abcam) ile 60 dakika

inkübasyona bırakıldı. Fosfat tamponu ile 3 kez yıkandı. Daha sonra sinyal artırıcıda 20 dakika tutuldu. Fosfat tamponu ile 3 kez yıkandı. HRP, POLYMER (biotinylated goat anti-polyvalent + streptavidin) da 30 dakika tutuldu. Fosfat tamponu ile 3 kez yıkandı. AEC Kromojen uygulandı ve 5 dakika inkübasyona bırakıldı. Çeşme suyunda 30 saniye yıkandı ve Hemotoksilin ile zemin boyaması yapıldı. Çeşme suyu ile 1 dakika yıkama yapıldı. Distile su ile 30 saniye yıkama yapıldı. Lamlar havada kurutuldu. Sentetik yapıştırıcı damlatılıp lamel ile kapatıldı.

4.7.3.Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop (LTKM)

LTKM, biyolojik ve bilimsel araştırmalarda canlı ve fikse edilmiş, 100 µm kalınlığında değişen ince hücre ve doku kesitlerini görüntülemek için kullanılmaktadır. Konfokal mikroskopi lazer ve bilgisayar teknolojisi açısından avantajlara sahiptir. Bu avantaj hücresel ve moleküler seviyedeki etkileşimleri yüksek çözünürlükte ve üç boyutlu şekilde görüntülemeyi sağlamaktadır. Konfokal mikroskopi hücrelerde oluşan büzüşme, membran tomurcuklanması, kromatin yoğunlaşması, yoğunlaşma, DNA parçalanması, çekirdek parçalanması gibi birçok mekanizma ile birlikte apoptoza neden olan moleküler sinyalleri de belirleyebilmektedir (Claxton vd., 2006).

4.7.3.1. Testis Doku Örneklerinin Konfokal Mikroskobik Analizi

Uygulanan maddelerin verildiği testis dokuları 37 °C'de 24 saat süresince bekletildi. İnkübasyon sonunda doku PBS ile yıkandı, oda sıcaklığında 15 dakika %2 gluteraldehid ile fikse edildi. Sonrasında doku PBS ile yıkayıp falloidin ve akrinin oranj ile boyandı. Boyanmış doku kesitleri mikroskobik olarak incelenerek çekirdek ve hücre zarlarının yapısına bakıldı, apoptotik ve nekrotik hücreler belirlendi. Doku üzerindeki yapısal değişiklikler Leica TCS- SP5 II konfokal mikroskop kullanılarak görüntülendi ve software (Leica Confocal Software Version 2.00) kullanıldı.

4.8. İstatistiksel değerlendirmeler

Deneysel çalışmalarımızın verilerin değerlendirilmesinde “SPSS 21.0” versiyonu bilgisayar paket programı kullanıldı. Grupların karşılaştırılmasında sürekli nicel veriler; n,

ortalama ve standart sapma olarak, nitel veriler ise n, ortanca değer, 25'inci ve 75'inci yüzdelik değerler olarak ifade edildi. Bağımsız ölçümlerden oluşan ve normal dağılım gösteren değişkenlere One Way Analysis of Variance (Tek Yönlü Varyans Analizi) testi uygulanmıştır. $p < 0.05$ olasılık değerleri önemli olarak kabul edilmiştir.

5.BULGULAR VE TARTIŞMA

5.1. Biyokimyasal Analizler

Bütün deney grupları ve SF ile DMSO (Dimetilsülfoksit) verilen kontrol gruplarının GSH, SOD, CAT, TAS, MDA, TOS, OSİ ortalama değerleri istatistiksel olarak Çizelge 5.1 ve Çizelge 5.2’de ayrı ayrı karşılaştırılmış; GSH, SOD, CAT, TAS, MDA, TOS, OSİ değerleri ayrıca grafiksel olarak da gösterilmiştir (Şekil 5.1, Şekil 5.2, Şekil 5.3, Şekil 5.4, Şekil 5.5, Şekil 5.6, Şekil 5.7).

150 mg/kg CP uygulanan deney grubunda MDA, TOS, OSİ seviyeleri kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan ileri derecede önemli artış göstermiştir ($p<0.001$). Bu grupta GSH, SOD, CAT ve TAS seviyeleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli bir azalma göstermiştir ($p<0.001$).

25, 50, 100 HT uygulanan deney gruplarında MDA, TOS, OSİ, GSH, SOD, CAT ve TAS seviyeleri kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde anlamlı bir fark bulunmamıştır. Yine bu grupta MDA, TOS, OSİ seviyeleri 150 mg/kg CP grubu ile karşılaştırıldığında HT dozunun artışına paralel olarak bu 3 oksidatif stres parametreleri azalma göstermiştir ($p<0.001$). GSH, SOD, CAT ve TAS seviyeleri ise HT dozunun artışına paralel olarak artma göstermiştir ($p<0.001$).

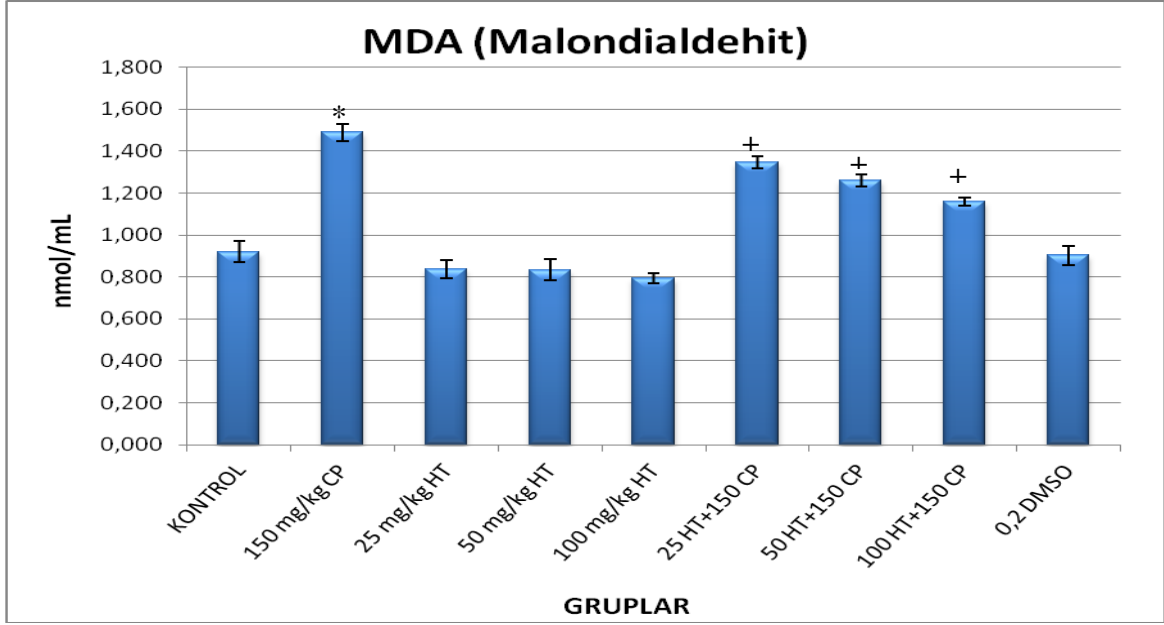
150+25, 150+50, 150+100 mg/kg CP+HT birlikte uygulanan deney gruplarının ve kontrol gruplarının MDA, GSH, SOD, CAT, TOS, TAS, OSİ ortalama değerleri istatistiksel karşılaştırılması Bkz. Çizelge 5.1. ve Çizelge 5.2’de gösterilmiştir. 150 mg/kg CP + HT verilen deney gruplarında MDA, TOS, OSİ düzeyleri kontrol grubuna göre sırasıyla %12, %18 ve %51 oranlarında artmıştır ($p<0.05$).

Çizelge 5.1 Deney gruplarına ait hayvanların kan serum örneklerinde belirlenen MDA, GSH, SOD ve CAT miktarlarının ortalama değerleri \pm standart hata değerleri (n=7).

	MDA (nmol/mL)	GSH (μ M)	SOD (U/mL)	CAT (Nmol/dk/ mL)
1.Grup (Kontrol)	0.921 \pm 0.05	4.897 \pm 0.46	20.916 \pm 1.31	30.157 \pm 1.59
2.Grup (150 mg/kg CP)	1,489 \pm 0,04	2,134 \pm 0,09	11,181 \pm 1,25	19,243 \pm 1,20
3.Grup (25 mg/kg HT)	0,835 \pm 0,04	4,997 \pm 0,29	21,269 \pm 1,18	31,117 \pm 0,92
4.Grup (50 mg/kg HT)	0.834 \pm 0.05	5.046 \pm 0.28	21.420 \pm 0.90	31.706 \pm 1.03
5.Grup (100 mg/kg HT)	0,795 \pm 0.02	5.263 \pm 0.23	22.414 \pm 1.05	32.014 \pm 0.65
6.Grup (25 HT+150 CP)	1.348 \pm 0.03	2.543 \pm 0.12	14.131 \pm 0.88	22.191 \pm 1.35
7.Grup (50 HT+150 CP)	1.260 \pm 0.03	3.009 \pm 0.15	15.437 \pm 0.42	23.689 \pm 1.28
8.Grup (100 HT+150 CP)	1.159 \pm 0.02	3.894 \pm 0.20	17.020 \pm 1.01	25.861 \pm 1.15
9.Grup (0.2 DMSO)	0.902 \pm 0.05	4.886 \pm 0.30	21.360 \pm 0.78	31.391 \pm 0.78

Çizelge 5.2 Deney gruplarına ait hayvanların kan serum örneklerinde belirlenen TAS, TOS ve OSİ miktarlarının ortalama değerleri \pm standart hata değerleri (n=7).

	TOS (mikromol Troloxequivalent/L)	TAS (mikromol (H₂O₂ equivalent/L)	OSİ (TOS/TAS)/10
1.Grup (Kontrol)	0.209 \pm 0.01	1.317 \pm 0.09	0.016 \pm 0.00
2.Grup (150 mg/kg CP)	2.754 \pm 0.23	1.034 \pm 0.03	0.266 \pm 0.02
3.Grup (25 mg/kg HT)	0.222 \pm 0.02	1.330 \pm 0.05	0.017 \pm 0.00
4.Grup (50 mg/kg HT)	0.223 \pm 0.01	1.383 \pm 0.04	0.016 \pm 0.00
5.Grup (100 mg/kg HT)	0.208 \pm 0.01	1.409 \pm 0.03	0.015 \pm 0.00
6.Grup (25 HT+150 CP)	2.164 \pm 0.04	1.144 \pm 0.03	0.189 \pm 0.01
7.Grup (50 HT+150 CP)	1.557 \pm 0.17	1.191 \pm 0.03	0.131 \pm 0.02
8.Grup (100 HT+150 CP)	1.083 \pm 0.07	1.286 \pm 0.05	0.084 \pm 0.01
9.Grup (0.2 DMSO)	0.212 \pm 0.00	1.349 \pm 0.04	0.016 \pm 0.00

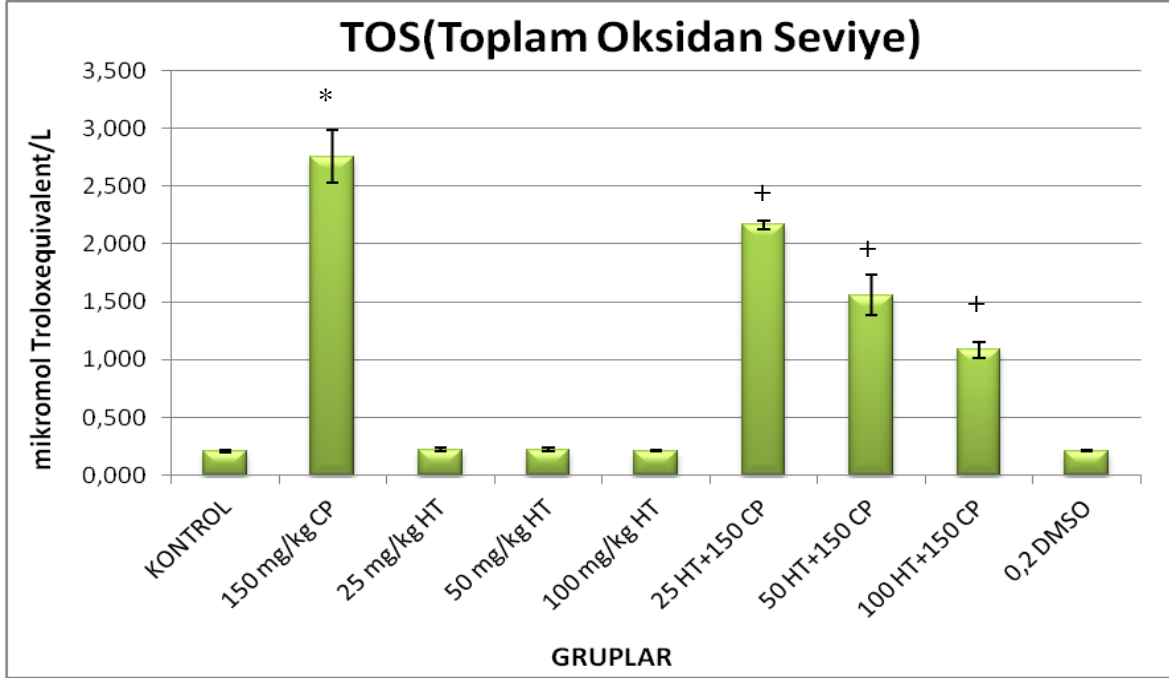


Şekil 5.1 Tüm Gruplara ait plazma MDA seviyelerinin ortalama ve standart hata grafiği * $p < 0.001$ kontrol grubuna göre ve + $p < 0.001$ CP grubuna göre önem derecesinde farklıdır.

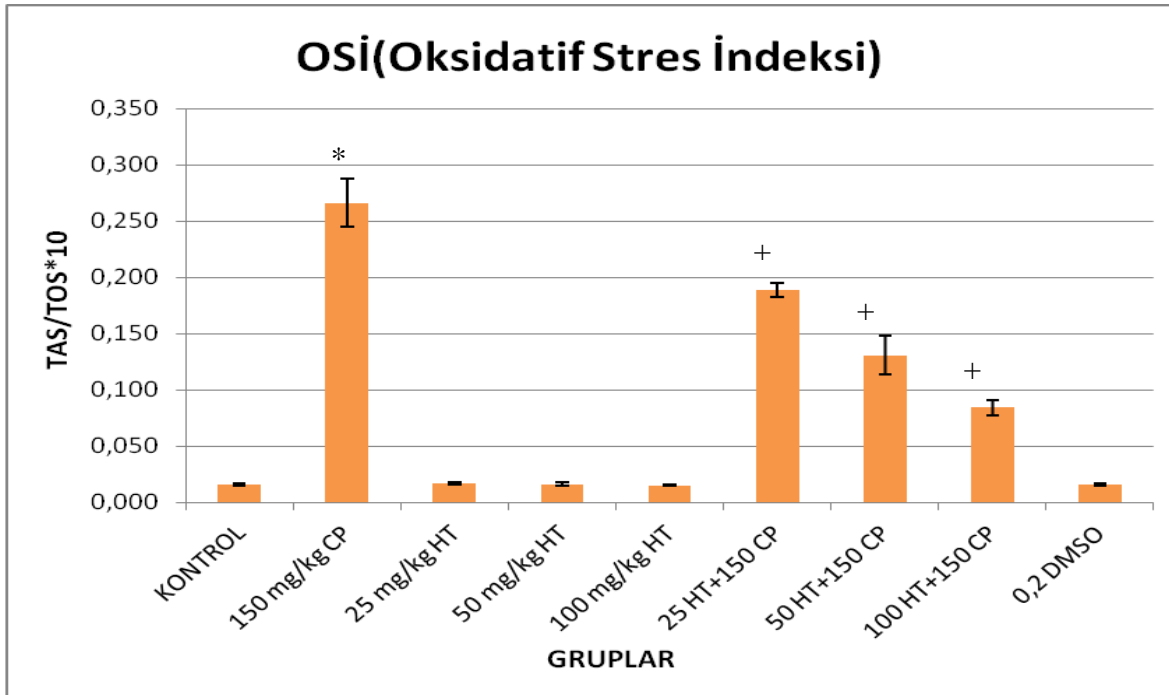
Çizelge 5.1’de de görüldüğü gibi 150 mg/kg CP verilen deney grubu ile 150+25, 150+50 ve 150+100 mg/kg CP+HP verilen deney grupları MDA değerleri bakımından karşılaştırıldıklarında istatistiksel açıdan ileri derecede önemli bir fark görülmektedir ($p < 0.001$). Bu deney gruplarının hepsi kontrol grubuna göre de MDA düzeyi bakımından farklı bulunmuştur. 150 mg/kg CP ile birlikte verilen HP’ün dozu arttıkça MDA seviyesi kontrol düzeyine yaklaştırmıştır.

150 mg/kg CP verilen gruptaki TOS değeri kontrol grubuna göre ileri derecede artma göstermiştir ($p < 0.001$). Sadece HT verilen gruplarla kontrol grubu arasında TOS değeri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$). CP ile birlikte verilen HT’un 25, 50 ve 100 mg/kg’lık dozlarındaki TOS değeri sadece CP verilen gruba göre sırasıyla %70, %70 ve %78 oranlarında azalmıştır ($p < 0.001$). 150+25, 150+50 ve 150+100 mg/kg CP+HT uygulanan gruplar arasında TOS değeri HT miktarı arttıkça bir miktar azalmış ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$).

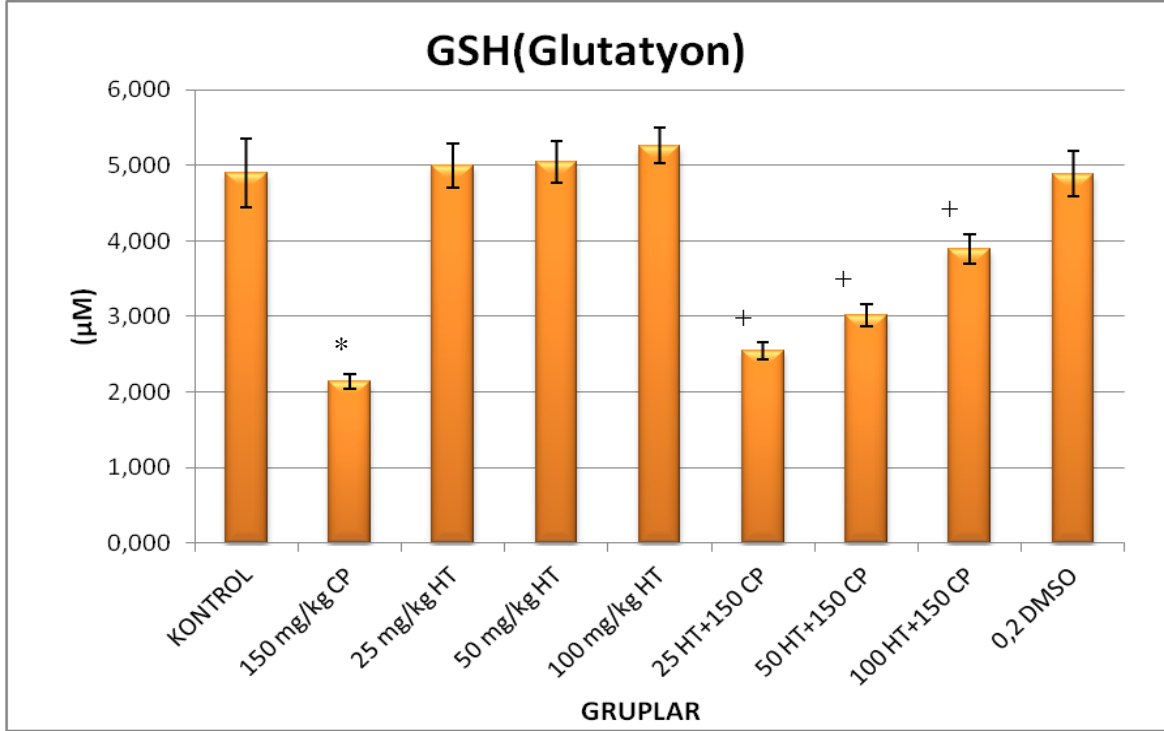
Çizelge 5.2’de görüldüğü gibi, sadece 150 mg/kg CP verilen gruptaki OSI değeri kontrol grubuna göre % 1219 oranında artarak istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bir fark göstermiştir ($p < 0.001$).



Şekil 5.2 Tüm Gruplara ait serum TOS seviyelerinin ortalama ve standart hata grafiği * $p < 0,001$ kontrol grubuna göre ve + $p < 0,001$ CP grubuna göre önem derecesinde farklıdır.

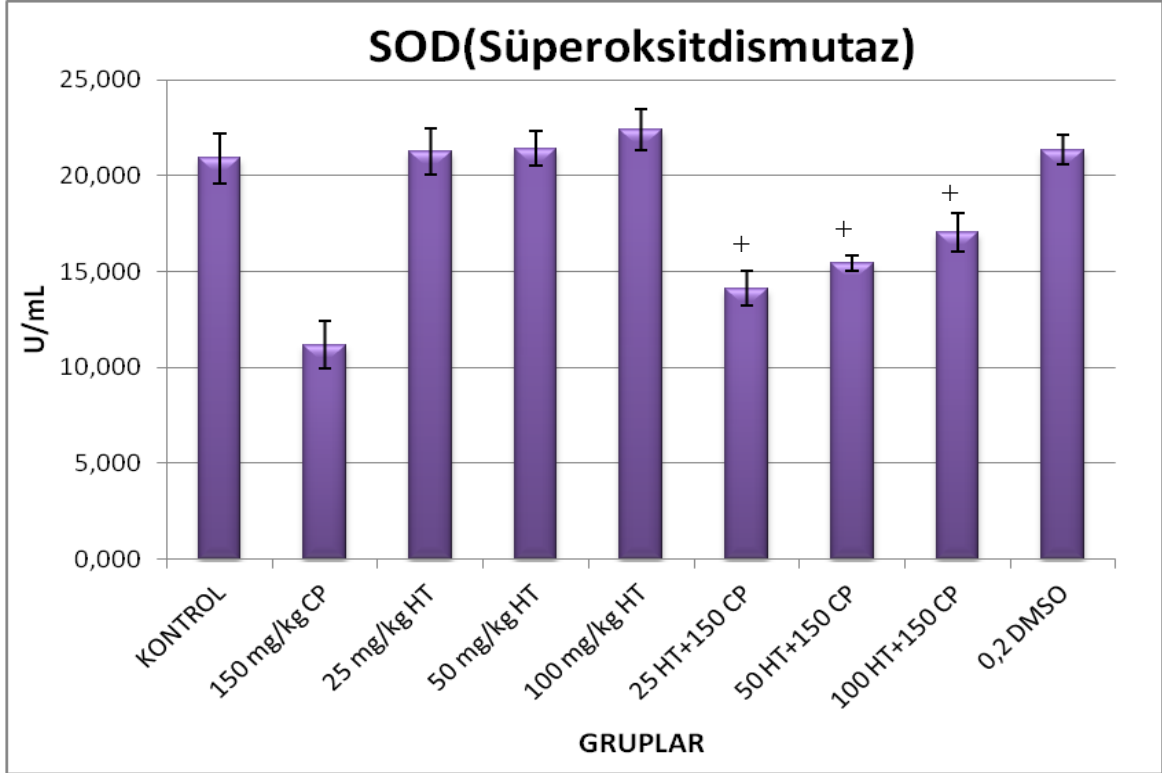


Şekil 5.3 Tüm Gruplara ait serum OSİ seviyelerinin ortalama ve standart hata grafiği * $p < 0,001$ kontrol grubuna göre ve + $p < 0,001$ CP grubuna göre önem derecesinde farklıdır.



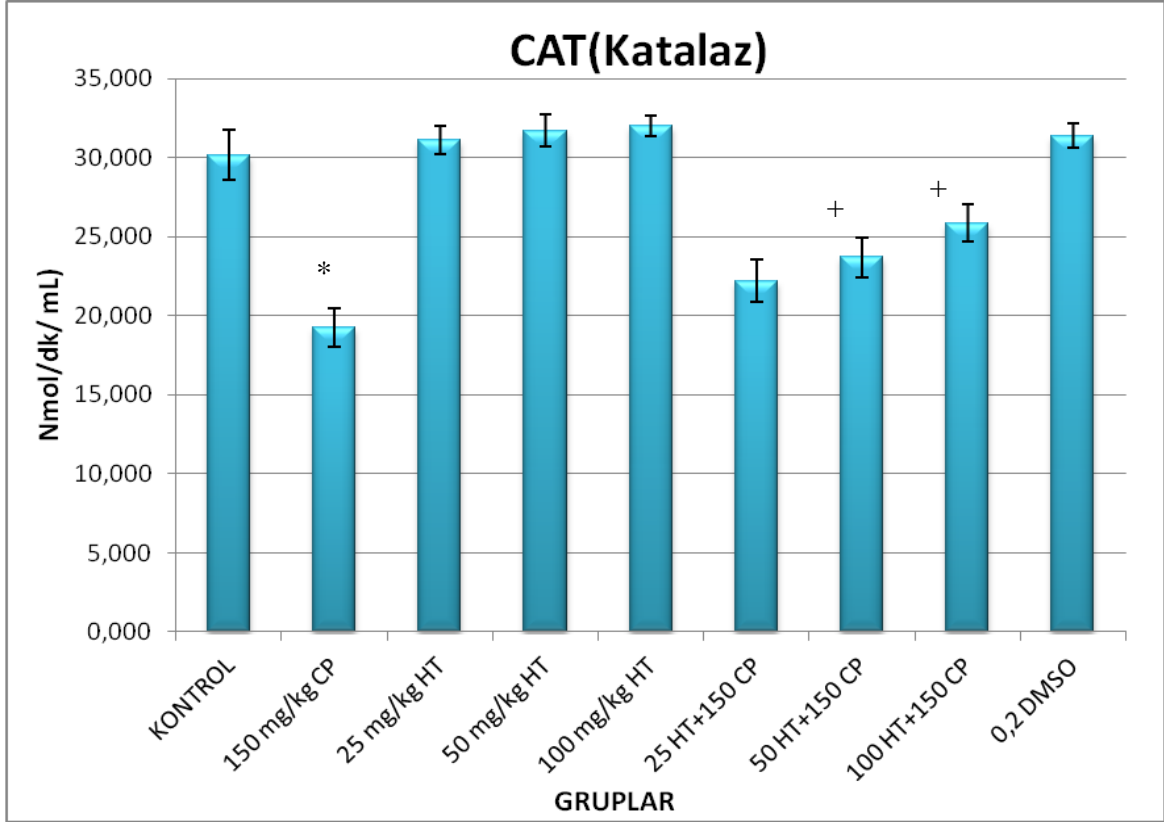
Şekil 5.4 Tüm Gruplara ait serum GSH seviyelerinin ortalama ve standart hata grafiği * $p < 0.001$ kontrol grubuna göre ve + $p < 0.001$ CP grubuna göre önem derecesinde farklıdır.

Şekil 5.4’de görüldüğü gibi 150 mg/kg CP verilen deney grubu ile 150+25, 150+50 ve 150+100 mg/kg CP+HT verilen deney grupları GSH değerleri bakımından karşılaştırıldıklarında istatistiksel açıdan ileri derecede önemli bir fark gözlemlenmektedir ($p < 0.001$). Yine bu deney gruplarının hepsi kontrol grubuna göre GSH düzeyi bakımından ileri derecede önemli bir fark göstermiştir ($p < 0.001$). 150 mg/kg CP ile birlikte verilen HT’ün 100 mg/kg’lık dozu GSH seviyesini kontrol düzeyine yaklaştırmıştır. Şekil 5.4’de görüldüğü gibi, CP nedenli toksisiteye karşı HT’nin dozu arttıkça GSH seviyesini paralel olarak kontrole yaklaştırmıştır.



Şekil 5.5 Tüm Gruplara ait serum SOD seviyelerinin ortalama ve standart hata grafiği * $p < 0,001$ kontrol grubuna göre ve $^+p < 0,001$ CP grubuna göre önem derecesinde farklıdır.

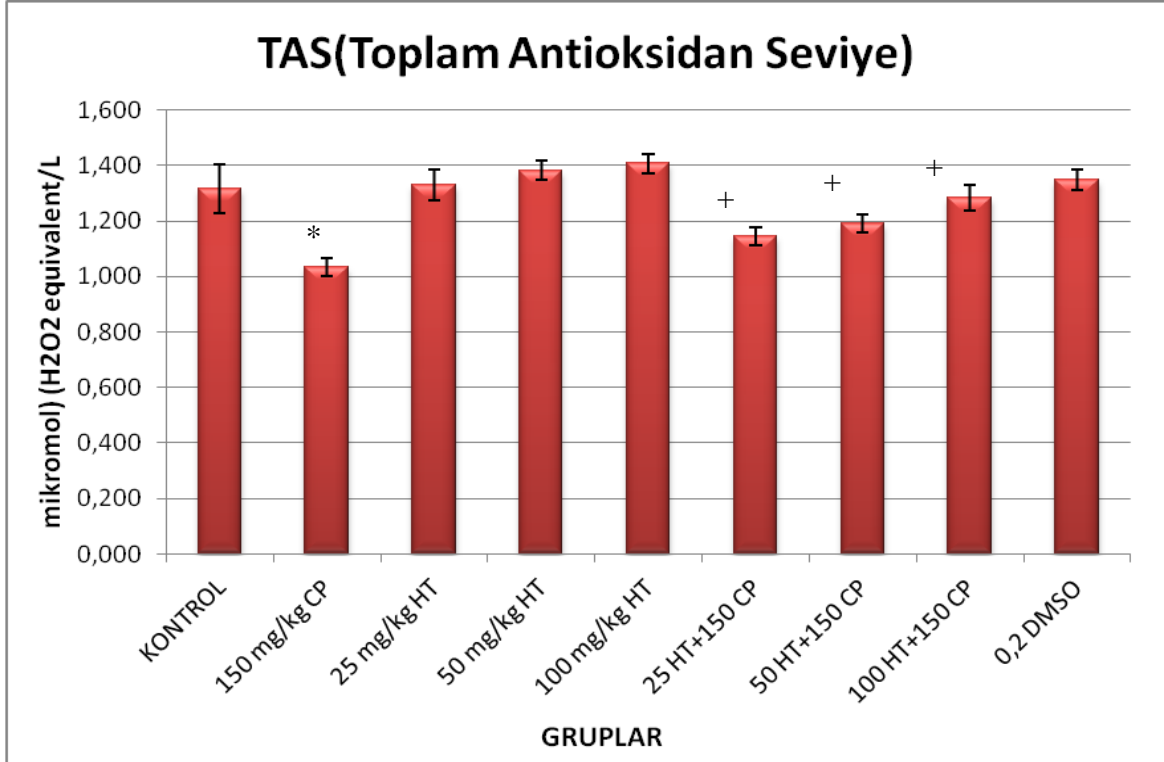
Çizelge 5.1’de gösterilen verilere göre, SOD düzeyi CP uygulanan grupta kontrol grubuna göre % 46 oranında azalmıştır ($p < 0.001$). Sadece HT (25, 50 ve 100 mg/kg) verilen gruplarda SOD seviyesi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik göstermemiştir ($p > 0.05$). CP ile birlikte 25, 50 ve 100 mg/kg HT uygulanan gruplardaki SOD seviyesi sadece CP verilen gruba göre sırasıyla % 20, % 28 ve % 34 oranlarında artmıştır ($p < 0.001$). 150+100 mg/kg CP+HT verilen deney grubundaki SOD seviyesi 150+25 ve 150+50 mg/kg CP+HT uygulanan gruplara göre sırasıyla % 12 ve % 10 oranında artmış, ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$).



Şekil 5.6 Tüm Gruplara ait serum CAT seviyelerinin ortalama ve standart hata grafiği * $p < 0,001$ kontrol grubuna göre ve + $p < 0,001$ CP grubuna göre önem derecesinde farklıdır.

Çizelge 5.1’de görüldüğü gibi sadece CP uygulanan grubun CAT seviyesi kontrol grubuna göre %36 oranında azalmıştır ($p < 0,001$). 25, 50, 100 mg/kg HT uygulanan gruplarda ve DMSO grubunda CAT seviyesi kontrol grubu ile benzerlik göstermektedir. 150+25, 150+50 ve 150+100 mg/kg CP+HT verilen gruptaki CAT seviyesi sadece CP verilen gruba göre sırasıyla %13, %18 ve %25 oranlarında artmıştır ($p < 0,001$). 150+100 mg/kg CP+HT uygulanan deney grubundaki CAT miktarı 150+50 mg/kg CP+HT uygulanan gruba göre %8 oranında artmıştır ($p < 0,001$). Yine 150+50 mg/kg CP+HT uygulanan deney grubundaki CAT miktarı 150+25 uygulanan gruba göre %16 oranında artmıştır ($p < 0,001$).

CP+HT kompleks gruplarında HT miktarı arttıkça paralel bir şekilde GSH, SOD, CAT ve TAS parametrelerinde artış göstermektedir.



Şekil 5.7 Tüm Gruplara ait serum TAS seviyelerinin ortalama ve standart hata grafiği * $p < 0,001$ kontrol grubuna göre ve $^+p < 0,001$ CP grubuna göre önem derecesinde farklıdır.

Çizelge 5.2 'de görüldüğü gibi, sadece CP verilen gruptaki TAS değeri kontrol grubuna göre %12 oranında azalmıştır ($p < 0,001$). TAS değeri 25, 50 ve 100 mg/kg HT verilen gruplarda kontrol grubuna göre sırasıyla %48 ve %55 oranlarında artmıştır ($p < 0,001$). 150+25, 150+50 ve 150+100 mg/kg CP+HT verilen gruptaki TAS değeri sadece 150 mg/kg CP verilen gruba göre sırasıyla %18, %22 ve %25 oranlarında artmıştır ($p < 0,001$). 150+100 mg/kg CP+HT uygulanan deney grubundaki TAS miktarı 150+50 mg/kg CP+HT uygulanan gruba göre %29 oranında artmıştır ($p < 0,001$). Yine 150+50 mg/kg CP+HT uygulanan deney grubundaki TAS miktarı 150+25 uygulanan gruba göre %29 oranında artmıştır ($p < 0,001$).

Verilerimizden anlaşıldığı gibi sadece CP verilen grupta MDA, TOS ve OSİ seviyeleri CP nedenli oksidatif stresi yansıtacak şekilde ciddi bir artış gösterirken CAT, SOD, GSH ve TAS seviyeleri ise ciddi bir azalma göstermiştir. Bazı deneysel ve klinik çalışmaların sonuçları çalışmamız ile benzerlik göstermektedir.

Çeribaşı vd., 2009 yılında yaptıkları bir çalışmada 8 hafta boyunca her hafta 15 mg/kg CP nedenli oluşturulan testiküler toksisiteye karşı antioksidan maddeler olan likopen ve ellagik asidin koruyucu rolünü incelemişlerdir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre sadece CP verilen grupta plazma MDA ve eritrosit SOD seviyeleri ciddi bir artış gösterirken CAT seviyesi azalmıştır. CAT aktivitesinin azalması ise muhtemelen bu antioksidanın optimal bir şekilde kullanılması sonucu serbest radikalleri süpürmesinden kaynaklanmaktadır. Bizim çalışmamızda bu çalışmadan farklı olarak CP'nin 150 mg/kg gibi yüksek dozu akut hasar oluşturulmak üzere kullanılmıştır. Tüm antioksidan enzimlerin aynı zamanda azalması muhtemelen bu nedenledir.

Vardı vd., 2010 yılında yaptığı çalışmada kemoterapik bir ajan olan metotraksatin (MTX) neden olduğu testiküler hasara karşı antioksidan bir madde olan klorojenik asidin (ChA) koruyucu etkileri çeşitli yöntemler ile incelenmiştir. MTX grubunda MDA yükselirken CAT, SOD, GPx değerleri kontrol grubuna göre azalma göstermiştir. Kombine (MTX+ChA) grubunda MTX grubuna göre MDA düşerken, SOD, CAT ve GPx enzim değerleri kontrol grubuna benzer bulunmuştur. Bizim çalışmamızda sadece CP verilen grupta MDA, TOS ve OSİ değerleri artarken CAT, SOD, TAS ve GSH düzeyleri önemli oranda azalmıştır. CP+HT kombine gruplarında MDA, TOS ve OSİ değerleri azalırken CAT, SOD, TAS ve GSH düzeyleri önemli oranlarda artarak kontrol seviyelerine yaklaşmıştır.

Biyokimyasal analizlerde bazı çalışmalarda verilen ajan, dokudaki MDA seviyesini yükseltirken, SOD, CAT ve GPx aktivitelerini ise düşürebiliyor (Özkaya vd., 2002). Bazı çalışmalarda ise CAT ve SOD seviyesini arttırabiliyor (Alıcıgüzel vd., 2003). Bu çalışmalardaki farklılık kemoterapik ajanın kimyasal yapısına, ürettiği metabolitlere ve verilen doz miktarına bağlı olarak değişebilmektedir. Aynı zamanda dokunun antioksidan savunma mekanizması ile dokuda oluşan ROS'ların dengesine bağlı olabilir.

5.2. Histolojik Analizler

Biyokimyasal sonuçlarımıza paralel olarak histopatolojik bulgularımızda, 150 mg/kg miktarında verilen CP dozu sıçan testislerinde seminifer tübüllerde dejenerasyon ve hücre kayıplarının oluştuğunu histolojik ve immünohistokimyasal sonuçlarımız göstermektedir.

Deneyel çalışmamızda sadece CP verilen grubun testis dokusunda seminifer tübüllerde atrofi, germinal hücrelerde dökülme ve apoptosis durumları gözlenmiştir. Kim vd., (1999) ve Ateşşahin vd., (2006) yılında yaptığı çalışmalarda kanser tedavisinde kullanılan ilaçların germ hücrelerini incelttiği ve seminifer lümen çapını azalttığı aynı zamanda germ hücrelerinde dejenerasyon ve dökülmeye neden olduğunu rapor etmişlerdir.

Histolojik bulgularımız sadece HT ve DMSO verilen gruplara ait hayvanların testiküler dokularında herhangi bir histopatolojiye rastlanmamıştır. Kontrol grubu ile bu gruplar benzerlik göstermektedir (Şekil 5.8).

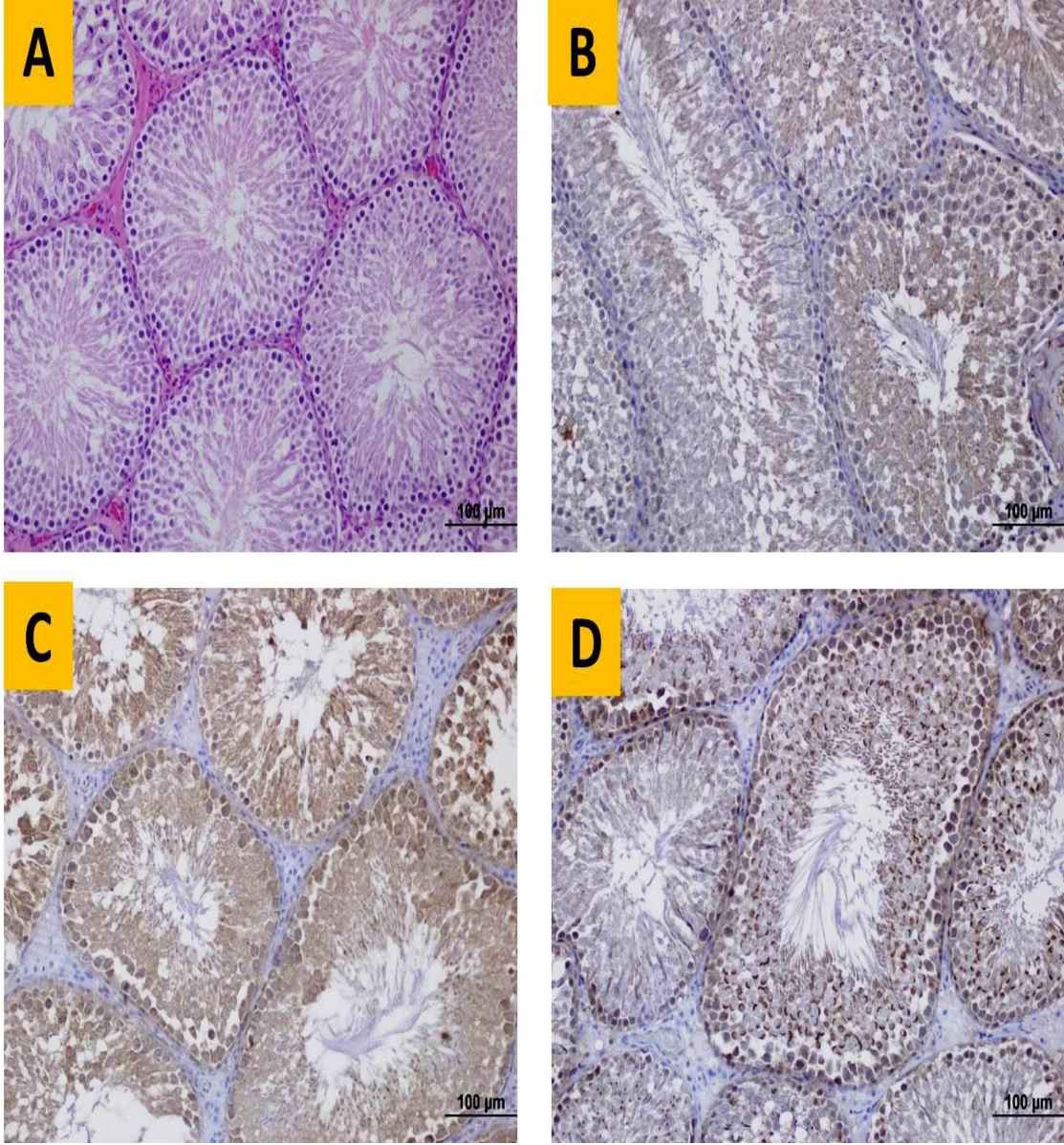
CP verilen grupta testis dokusunda majör bozukluklar görülmesine de, bazı hayvanların testislerinde seminifer tübüllerde dejenerasyon ve hücre kayıplarına rastlanmıştır (Şekil 5.9).

150+25, 150+50 ve 150+100 mg/kg CP+HT verilen kompleks gruplarda testis dokularında belirgin bozukluklar görülmedi. Ancak, HT dozu arttıkça testislerde daha normal histolojiye rastlandı

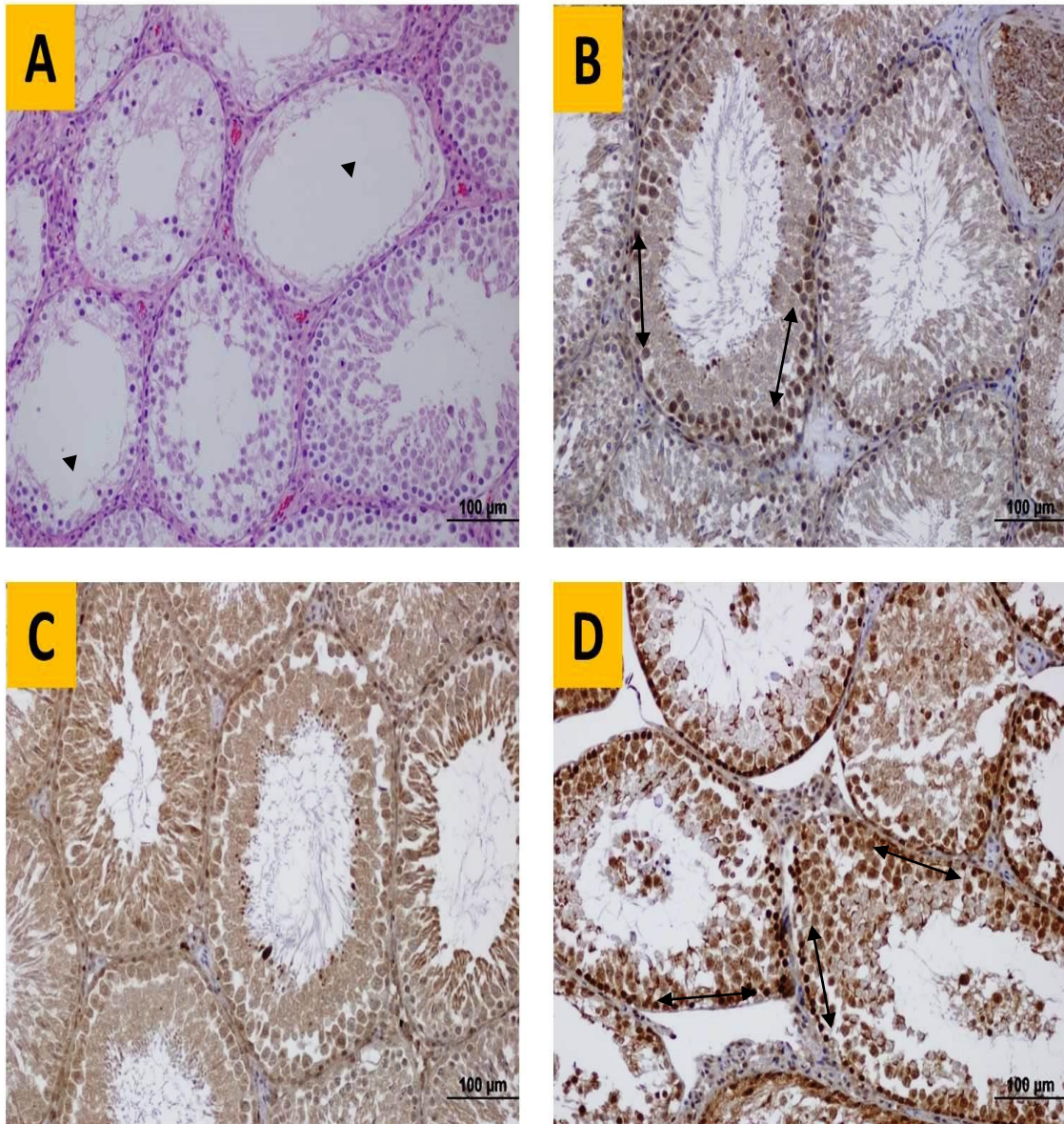
Apoptoz değerlendirmesi sonucunda Bcl-2, immünohistokimyası uygulanan testis kesitlerinde gruplar arasında belirgin farklar saptanmadı. Kaspaz-3 ve bax immünohistokimyası uygulanan testis kesitlerinde ise gruplar arasında farklar saptandı.

Sadece CP verilen deney grubunda Bcl-2 immünohistokimya boyanması çok az iken Bax ve Kaspaz-3 boyanması testiküler doku hasarını gösterecek nitelikte bulundu. Buna karşılık CP+HT kombine grubunda HT dozunun artışına paralel olarak apoptotik hücre yoğunluğunun azaldığını gösterecek düzeyde Bcl-2 artışı ve Bax ve Kaspaz-3 azalması belirlenmiştir. Sadece HT verilen deney gruplarında immünohistokimyasal

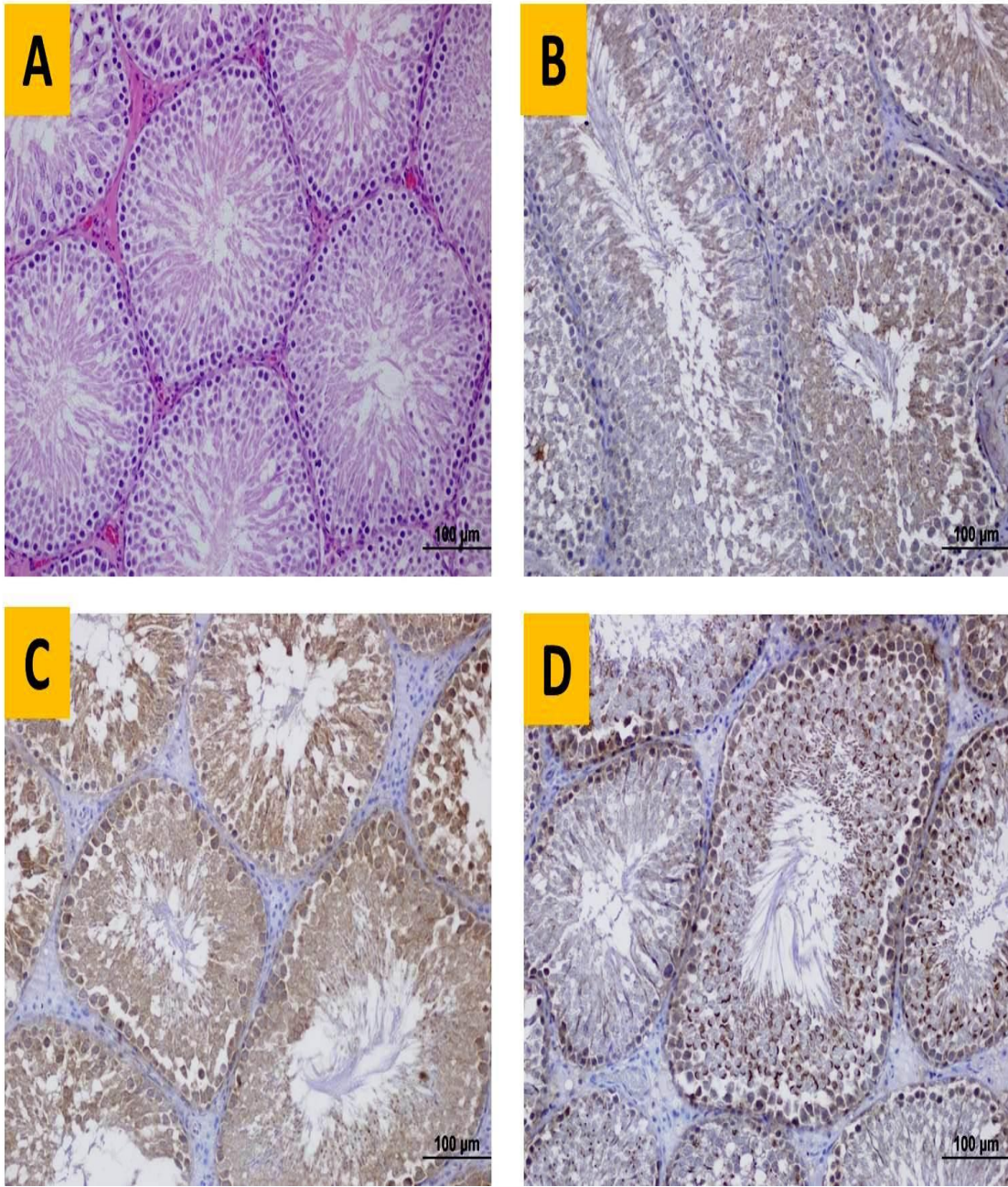
verimiz kontrol ile benzer bulunmuştur. İmmünohistokimya sonuçlarımıza göre CP nedenli hasarda hücre ölümlerinin apoptotik yolak üzerinden gerçekleştiğini göstermektedir.



Şekil 5.8. Kontrol grubuna ait histolojik (H-E) ve immünohistokimyasal (Bcl-2,Bax, Kaspaz-3) görüntüler **A**: H-E boyama ile normal histoloji , **B**: kaspaz-3 immünoreaktivitesi nötr, **C**: Bcl-2 immünoreaktiviteleri nötr, **D**: Bax immünoreaktivitesi nötr. Barlar 100 µm.

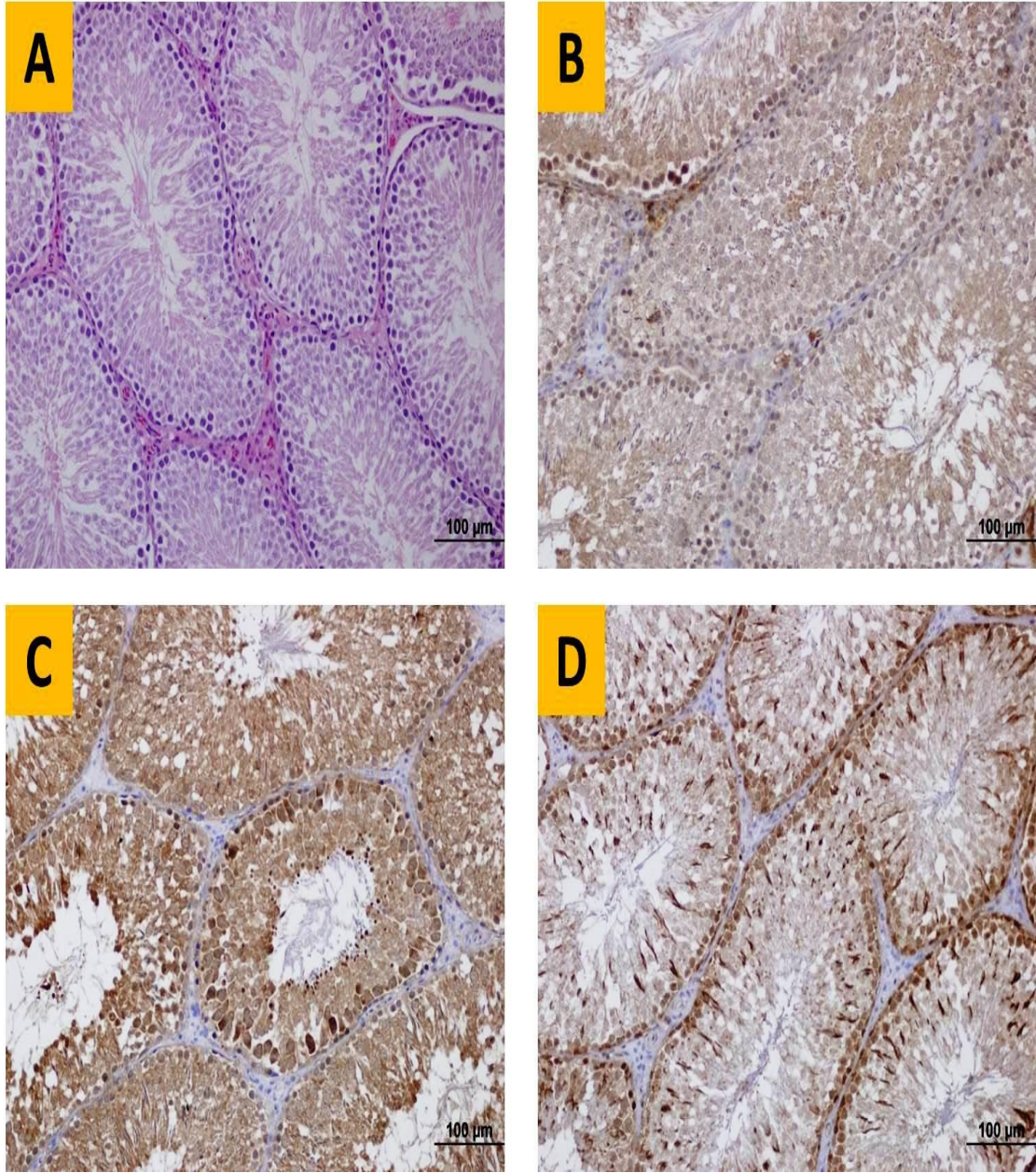


Şekil 5.9 150 mg/kg CP grubuna ait histolojik ve immünohistokimyasal görüntüler **A**: H-E boyama ve senifer tübüllerde deformasyon(▼)**B**: kaspaz-3 immünoreaktivitesi artmış(↔), **C**: Bcl-2 immünoreaktivitesi nötr, **D**: Bax immünoreaktivitesi artmış(↔)Barlar 100 µm.



Şekil 5.10.

100 HT grubuna ait histolojik (H-E) ve immünohistokimyasal (Bcl-2, Bax, Kaspaz-3) görüntüler
A: H-E boyama ile normal histoloji , B: kaspaz-3 immünoreaktivitesi nötr, C: Bcl-2 immünoreaktiviteleri nötr, D: Bax immünoreaktivitesi nötr. Barlar 100 µm.



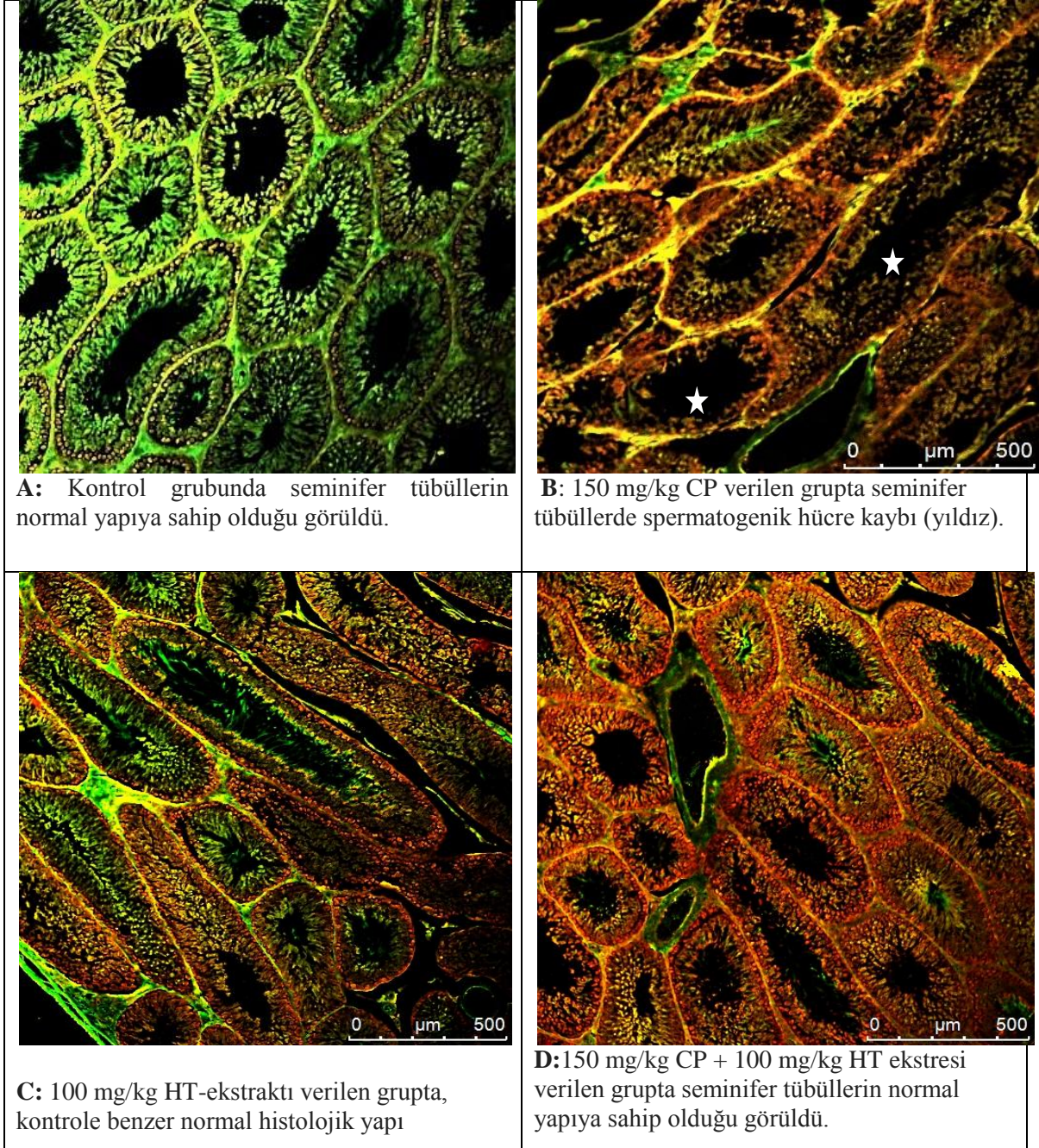
Şekil 5.11. 150 mg/kg CP + 100 HT grubuna ait histolojik (H-E) ve immünohistokimyasal (Bcl-2, Bax, Kaspaz-3) görüntüleri A: H-E boyama ile normale yakın histoloji, B: kaspaz-3 immünoreaktivitesi nötr, C: Bcl-2 immünoreaktivitesi diğer gruplara göre artmış, D: Bax immünoreaktivitesi nötr. Barlar 100 µm.

Kanser hücrelerinde bazı anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonunda artış olması ile beraber pek çok apoptotik yolak değişim göstermektedir. Örneğin, Bcl2, BclX1, Akt, NF-κB ve IAP protein ailesi. Bizde çalışmamızda testiküler dokudaki apoptotik hücreleri immünohistokimyasal olarak kaspaz 3, Bax ve Bcl2 aktiviteleri kullanılarak gözlemledik.

Buna ilave olarak Lazer Taramalı Konfokal mikroskopta canlı ve ölü hücreleri ayırt edebilmek için 2 ayrı boya ile (akridin orange ve falloidin) boyayarak inceledik. Shinado ve ark. 1999 da antikanser ilaçların testiküler germ hücrelerinde apoptosize neden olduğunu rapor etmişlerdir. Yine Vardı vd. 2010 yılındaki çalışmalarında metotraksat uygulanan grupta kaspaz 3 boyanma aktivitesinin arttığını gözlemlemiştir. Antioksidan madde olan Klorojenik asit verilen grupta ise kaspaz 3 aktivitesi önemli derecede azalma göstermiştir.

Kaspaz 3 apoptozisin erken safhalarında aktive olan endonükleazdır (Yang, 2006). Hücre ve dokunun hasarlanması durumunda apoptoz sinyali alınması ile hücrede biyokimyasal ve morfolojik değişimler gözlenir. Çekirdek DNA sını kaspaz 3 ün aktif olması ile parçalara ayrılır. Bunun yanı sıra Kaspaz 3 ile çalışılırken birincisi dokunun kaspaz 3 eksprese ettiğinin bilinmesi ikincisi dokuda apoptoza yol açan ajanın kaspaz 3 ü kırıp kırmadığının bilinmesi gerekir (Güleş ve Eren 2008). Çalışmamızda CP verilen grubumuzda kaspaz 3 ve Bax immün boyanması diğer gruplara göre ciddi bir şekilde artış gösterirken antiapoptotik bir protein olan Bcl2 immün boyanması ise azalma göstermiştir. Buda CP nin testiküler hasarda apoptotik hücre ölümüne neden olduğunu göstermektedir. Ayrıca 100 mg/kg HT nin CP ile kompleks verildiği grupta apoptotik hücre ölümüne karşı önemli rol oynadığını kaspaz 3 ve Bax'ın immün boyanma sıklığının azalması göstermektedir. İmmünohistokimyasal çalışmamızın yapılan çalışmaların sonuçları ile uyumlu olması CP nin testiküler dokuda ilaç direnci göstermemiş olabileceğidir.

Kanser hücresi yaşamını devam ettirebilmek için apoptotik yolları içeren bu genetik değişimlere sahip olduğundan, seçici olarak kanser hücrelerinin ölümüne yol açan, normal hücreleri ayıran, kanser hücrelerini apoptoza sürükleyecek molekülleri hedefleyen, anti-kanser ilaçların geliştirilmesi uygun bir tedavi stratejisi olarak öngörülmektedir. Kanser hücrelerinde apoptozun deregülasyonundan öncelikli olarak Bax/Bak ve mitokondri sinyal iletiminin etkilendiği görülmektedir. Bu nedenle apoptozisin tekrar işlevinin kazanılması için pro/anti-apoptotik proteinlerin arasındaki dengenin tekrar sağlanması oldukça çekici ve kabul görebilir bir stratejidir.



Şekil 5.12 Testis konfokal mikrograf görüntüleri **A:** Kontrol grubunda seminifer tübüllerin normal yapıda olduğu, **B:** 150 mg/kg CP verilen grupta bazı seminifer tübüllerde spermatogenetik hücre kayıplarının (yıldızlar) olduğu, **C:** 100 mg/kg HP ekstresi verilen grupta kontroldekine benzer normal histolojik yapının olduğu ve **D:** 150 mg/kg CP+100 mg/kg HP ekstresi verilen grupta seminifer tübüllerin normal yapıya kavuştukları görülmektedir. Barlar 500 µm, falloidin ve akridin oranji boyama.

Kanno vd., 2009 yılında CP nin 100, 150, 200, 250 mg/kg lık dozlarını yetişkin erkek farelere uygulayarak farklı organlarda hangi dozun daha etkili olduğunu tespit edebilmek için testis, epididimis, kalp, böbrek, akciğer ve karaciğer kütle kayıplarını ölçmüşlerdir. Bu

organlardan CP uygulanmış testis, epididimis ve karaciğerde kütle kaybı ciddi şekilde görülmüştür. Yine bu çalışmada fertilité parametre ölçümleri sonucunda kontrol, 100 mg/kg CP ve 150 mg/kg CP arasındaki ölçümde 150 mg/kg CP uygulanan sıçanlarda fertilitasyon %30 lara kadar düşmüştür. 150 mg/kg lık dozdan daha fazla olan 200 ve 250'lik CP dozlarında ise ölçüm yapılamamıştır. Kanno vd., gonadal fonksiyonların korunması için CP kemoterapisinde hastalara bu dozlardan daha düşük dozlarda uygulama yapılması gerektiğini söylüyorlar. Bizde çalışmamızda literatür ile uyumlu olarak CP nin 150 mg/kg lık tek dozunu intraperitoneal olarak uygulayıp gonadal hasarı optimal düzeyde gördük.

Kim vd., 2013 yılında 150 mg/kg lık CP dozunu intraperitoneal olarak 24 sağlıklı erkek sıçan üzerine uygulayıp dially disulfide (DADs) ın muhtemel koruyucu etkisini araştırmışlardır. Sıçanların sağ testis ve epididimislerini alıp fiske etmişler ve vücut ağırlıklarını ölçmüşlerdir. 56 günlük çalışmada ilk 14 gün CP nin yan etkilerinden dolayı vücut ağırlıkları şiddetli bir şekilde düşmüştür. Ductus epididimisteki sperm miktarları sayılmış tek doz CP uygulanan grupta sperm baş sayısı ve sperm motilitesi azalmıştır.

Deneyisel modellerde CP'nin 50, 100, 150 mg/kg 'lık dozları kullanılarak hayvanlar 6-72 saat içinde saksisifiye edilmiştir (Ayhancı vd., 2010; Abraham ve Isaac, 2011). Önceki çalışmalara bakarak bizde çalışmamızda 150 mg/kg'lık CP ile istenilen hasarı vererek antioksidan özelliği bilinen HT'nin 25, 50, 100 mg/kg'lık dozlarında optimum koruyucu dozu araştırdık.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kemoterapötiklerin özellikle de alkilleyici ajanların tedavi edici etkisinin yanında gonadotoksik etkisi oldukça yüksektir. Bu nedenle antikanser ilaçların sağlıklı ve kanser hastası erkeklerde üreme sistemi üzerindeki yan etkileri ile ilgili pek çok çalışma denenmiştir. Fakat sıçanlarda CP'nin indüklediği testiküler toksisite modellerinde HT uygulanan bir çalışma bulunmamaktadır. Bu deneysel çalışma sıçanlarda CP ile oluşturulan testiküler toksisiteyi önlemede ve korumada HT ile yapılan ilk çalışmadır.

Her ne kadar sentetik ilaç sanayiinin gelişmesi bitkilerin kullanımını azaltmışsa da, sentetik ilaçların tehlikeli yan etkilerinin bulunması ve bitkisel ilaçların çok yönlü etkiye sahip olmaları, bitkiler ve bunlardan elde edilen aktif bileşikler üzerindeki çalışmaların artmasına neden olmuştur. Çağımızın önemli hastalıkları ile başedebilmek için gündelik hayatımızda doğal ürünlerin kullanımını bir yaşam tarzı haline getirmek gerekmektedir. Sağlık ürünlerinin yanı sıra beslenme alışkanlıklarımızda da doğal ürünler tercih edilmelidir. Teknoloji ve kimyasal çağın hayatımıza getirdiği olumsuzluklardan dolayı bitkisel tedaviye başvuru gittikçe artmaktadır. Çok eski zamanlarda deneme yanılma yoluyla etkileri ortaya konulan ve halk arasında kullanılan bitkilerin bugünün laboratuvar ve teknik imkanları ile etken maddeleri tespit edilmektedir.

Çalışmamızda CP ile oluşturduğumuz toksisite enzim aktivitelerinin değişmesi ile uyumludur. Deneysel sonuçlarımıza göre CP nedenli oksidatif stres ve doku hasarı HT nin antioksidan özelliği ile azaltılabilir. Ayrıca, bireylerde, hastalığın verdiği korkular sonucu oluşan depresyon HT'un antidepresif ve sedatif özellikleri ile hafifletilebilir.

CP ile birlikte uyguladığımız HT'un dozunun artması ile doku hasarı ve nekroz gibi anormal histopatolojinin önemli oranda düzeltilebildiği görülmüştür. Literatür araştırmalarımız ve verilerimiz ışığında CP nedenli oksidatif stres ve toksisiteye karşı antioksidan, antiinflamatuvar, sedatif, antidepresif ve antikanserojen etkili HT bitki ekstresinin testis dokusundaki hasarı incelediğimiz parametrelerde kontrol grubumuza yakın hale getirdiğini ve antikanser ilaçların yan etkilerini azaltmada etkili bir ajan olabileceğini söyleyebiliriz.

Deneyisel bulgularımız göz önüne alındığında HT'nin, antikanser ilaçların toksik yan etkilerini önlemede doğal bir ürün olarak ilaç protokollerinde kullanılabileceğini göstermektedir. Nitekim HT testis dokusunu hem histolojik ve biyokimyasal hemde immünohistokimyasal olarak korumaktadır. Ancak HT'nin hücre koruyucu etkilerini daha kapsamlı bir şekilde araştırmanın gerekli olduğunu düşünmekteyiz. Bulunacak her olumlu sonuç hem hastanın hayatını olumlu yönde etkileyecek hemde kemoterapinin daha kısa zamanda sonuç vermesini sağlayarak olası ekonomik kaybın ve iş gücü kaybının da önüne geçilebilecektir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abraham P and Isaac B. Ultrastructural Changes in the Rat Kidney After Single Dose of Cyclophosphamide-Possible Roles for Peroxisome Proliferation and Lysosomal Dysfunction in Cyclophosphamide-Induced Renal Damage. *Hum Exp Toxicol.* 2011; 30: 1924.
- Aitken RJ., Harkiss D., Buckingham D., 1993, Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. *J.Reprod Fertil.* 98(1):257-265.
- Akino, K., Akita, S., Mizuguchi, T., Takumi, I., Yu, R., Wang, X., Rozga, J., Demetriou, A.A., Melmed, S., Ohtsuru, A., and Yamashita, S., 2005, A novel molecular marker of pituitary tumor transforming gene involves in a rat liver regeneration, *The Journal of Surgical Research*, 129, 142-146 p.
- Akkuş, İ., 1995, Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri, Mimoza Yayınları, s. 156.
- Allison, L.A., 2014, Temel Moleküler Biyoloji, Palme Yayıncılık, Ankara.s. 546-576.
- Alvarez JG. and Storey BT., 1995, Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol Reprod Dev.*42(3):334-346.
- Ames B.N., Gold L.S., 1997, Too Many Rodent Carcinogens. *Proc. Natl. Acad Sci.*;p.7772-7781.
- Apaydin S, Zeybek U, İnce İ, Elgin G, Karamenderes C, Öztür B. 1999, Hypericum triquetrifolium Turra extract exhibits antinociceptive activity in the mouse. *Ethnopharmacology.* 67: 307–312.
- Arı, M., Öğüt, S., Döğer, F.K., 2017, Kanserin önlenmesinde antioksidanların Rolü, Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi; 1,2, s.15-22.
- Atal S., 2014, Erişkin Erkek Sıçanlarda Metotreksat Kaynaklı Testis Hasarında Kurkuminin Etkisi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Varol Şahintürk).
- Atasoy, N., 2016, Çinko Oksit Nanopartikülleri Ve Siklofosfamidin Sıçanlarda Testis Histolojisi, Apoptozis Ve Oksidan-Antioksidan Değerler Üzerine Etkisi, Necmettin Erbakan Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji Embriyoloji Anabilim dalı, Yüksek Lisans Tezi, Konya.
- Ateş S, Olgun N. 2014, Kemoterapiye Bağlı Alopesi ve Yaşam Kalitesi. Hacettepe Üniversitesi Hemşirelik Fakültesi Dergisi. 67-80.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Ateşşahin A, Sahnalı E, Türk G, Ceribaşı AO, Yılmaz S, Yüce A,v.d 2006;Chemoprotective effect of melatonin against cisplatin-induced testicular toxicity in rats. J Pineal Res 41 (1):21-7.
- Assy, N., Gong, Y., Zhang, M., Pettigrew, N.M., Pashniak, D. And Minuk, G.Y., 1998, Use of proliferating cell nuclear antigen as a marker of liver regeneration after partial hepatectomy in rats, J Lab Clin Med, 131, 251-256 s.
- Aycicek A, Erel O, Kocyigit A, 2005, Decreased total antioxidant capacity and increasedoxidative stress in passive smoker infants and their mothers. Pediatr Int; 47: 635-639
- Ayhancı, A., Uyar, R., Aral, E., Kabadere, S., Appak, S., 2008, Protective Effect of Zinc on Cyclophosphamide-Induced Hematotoxicity and Urotoxicity, Biol.Trace Elem.Res., 126:186-193, p.
- Ayhanci A, Gunes S, Sahinturk V, Appak S, Uyar R, Cengiz M, Altuner Y, Yaman S, 2010, Seleno L-Methionine Acts on Cyclophosphamide-Induced Kidney Toxicity. Bio. Trace Elem. Res.,136:171-179.
- Baytop T., 1984, Therapy with Medicinal Plants in Turkey. Publications of Istanbul University, Istanbul. 185–186.
- Baytop A., 1991, Farmasötik Botanik Ders Kitabı, İstanbul Üniversitesi Basımevi ve Film Merkezi, İstanbul.
- Becit, M., 2017, Pknogenol ve Kurkuminin çeşitli kanser hücre hatlarında sisplatin sitotoksitesine etkilerinin incelenmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi (Tez Danışmanı Doç.Dr. Sevtap AYDIN).
- Bendich, A., 1990, Antioxidant vitamins and their functions in immune response, Clinical nutrition, s.
- Bernacki, R.J., Bansal, S.K., & Gurtoo, H.L., 1987, Combination of Mesna with Cyclophosphamide or Adriamycin in the Treatment of Mice with Tumors. Cancer Research. 47: 799-802.
- Bertoli A, Menichini F, Mazzetti M. 2003, Volatile constituents of the leaves and flowers of Hypericum triquetrifolium Tura. Flavour Fragr J. 18: 91-94.
- Block, K. I., Koch, A. C., Mead, M. N., Tothy, P. K., Newman, R. A., Gyllenhaal, C., 2007, Impact of antioxidant supplementation on chemotherapeutic efficacy: A systematic review of the evidence from randomized controlled trials. CancerTreatment Reviews,33(5), p. 407-418.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Borek, C., 2004, Dietary Antioxidants and Human Cancer, Integrative Cancer Therapies, 3(4), p. 333-34
- Boxtel, C., 2001, Drugs benefits and risks, Jofn Wiley and sons Ltd, s.187-200.
- Brock N, Pohl J, Stekar J, Scheef W. 1982, Studies on the urotoxicity of oxazaphosphorine cytostatics and its prevention--III. Profile of action of sodium 2-mercaptoethane sulfonate (mesna). Eur J Cancer Clin Oncol. Dec;18(12):1377-1387
- Browne H, Norian JM, et all. Gonadal Dysfunction. In: Devita VT, Hellman TS and Rosenberg's SA (Eds). Cancer, Philadelphia 2008, 8th edition, Chapter 63, p 2692-2710
- Burry, R.W., 2011, Controls for Immunocytochemistry: An Update, Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 59(1) 6-12.
- Byers T, Perry G., 1992, Dietary carotenes, vitamin C, and vitamin E as protective antioxidants in human cancers. Annu Rev Nutr.; 12: p. 139-159.
- Cabadak, H., 2008, Hücre Siklusu Ve Kanser, ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi, Derleme, 9(3):51-61.
- Can, G., 2005, Antineoplastik ilaçların yan etkileri ve hemşirelik yaklaşımları, Hemşirelikte Eğitim ve Araştırma Dergisi, 2, s.8-15.
- Can, S., 2014, Sıçanlarda Uzun Süreli Böbrek İskemi / Reperfüzyon Hasarına Karşı Geraniol 'ün Koruyucu Etkisi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, s. 107.
- Cavalletti E., Tofanetti O, Zunino F, 1986, Comparision of Reduced Glutathione with 2Mercaptoethane Sulfonate to Prevent Cyclophosphamide Induced Urotoxicity, Cancer letters, 32: 1-6.
- Cassady JM, Baird WM, Hang CJ. J. Nat. Prod. 1990, 53, 23.
- Chen, C.L., Huanh, C.H., Sung, J.M., 2009, Antioxidants in aerial parts of Hypericum sampsonii, Hypericum japonicum and Hypericum perforatum, International Journal of Food Science and Teknology, 44,2249-2255.
- Cirak C, 2008, Radusiene J, Saglam B. Variation of bioactive substances in Hypericum montbretii during plant growth. Nat Prod Res. 22: 246-252.
- Cirak C, 2011, Radusiene J, Janulis V, Ivanauskas L, Camas N, Ayan AK. Phenolic constituents of Hypericum triquetrifolium Turra (Guttiferae) growing in Turkey: variation among populations and plant parts. Turk J Biol. 35-449-456.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Claxton, N.S., Fellers, T.J., Davidson, M.W., 2006, *Laser scanning confocal microscopy*, Department of Optical Microscopy and Digital Imaging, National High Magnetic Field Laboratory, Florida State University, 37 p., Unpublished (<http://www.olympusfluoview.com/theory/LSCMIntro.pdf>).
- Coggins PR., Ravdin RG., Eisman SH., 1960, Clinical evaluation of a new alkylating agent: cytoxan (cyclophosphamide), *Cancer*,;13,1254–60
- Conforti F, Statti GA, Tundis R, Menichini F, Houghton P., 2002, Antioxidant activity of methanolic extract of *Hypericum perforatum* Turra aerial part. *Fitoterapia*, , 73: 479–483.
- Cooper, G.M., 2016, *The Cell: A Moleküler Approach*, Seventh Edition, Sinauer Associates, p.1002/1006
- Çevik, B., Pirinççi, E., 2017, Beslenme ve kanser, *Fırat Tıp Dergisi*, s.1-7.
- Çeribaşı A.O., Türk G., Sönmez M., Sakin F. And Ateşşahin A., 2010, Toxic Effect of Cyclophosphamide on Sperm Morphology, Testicular Histology and Blood Oxidant-Antioxidant Balance and Protective Roles of Lycopene and Ellagic Acid. *Basic Clinical Pharmacology Toxicology*, 107, 730-736.
- Dollery., 1999, Cyclophosphamide In Dollery C, editör *Therapeutic drugs*, EdinburgChurchill Livingstone, p. 349-53.
- Couladis M, Badisa RB, Baziou P. 2002, Antioxidant and cytotoxic activities of *Hypericum* spp. on brine shrimps and human cancer cell lines. *Phytotherapy Research*. 16: 719–722.
- Chu YH, 2000, Chang CL, Hsu HF. Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity. *J Sci Food Agric*. 80: 561-566.
- Çiftçi, N., 2017, Oksidatif Stresin Kanserdeki Rolü: Antioksidanlar Kansere Progresyonunun Yakıtı Olabilir mi?, *Ahi Evran Tıp Dergisi*, s.8-13.
- Demirelli, F.H., 2003, Kanserin Moleküler Genetik Temelleri, *Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Güncel Klinik Onkoloji*, 37, s.9-15.
- Dilek, İ., 2010, Kemoterapide Toksikite Değerlendirmesi, TCSB Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Ankara, XXXVI. Ulusal Hematoloji Kongresi, Belek, Antalya .
- Dural, E.A.Ö., 2008, *Farmakoloji*, Nobel Tıp Kitapevi, s. 485-489.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Efdal, A., 2014, Siklofosfamid İle Oluşturulmuş Karaciğer Hasarı Üzerine Vitamin D3'ün Etkileri, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi. S.96.
- Erel, O. A., 2004, Novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions, *Clin Biochem*, 37: 112-119, p.
- Erel, O. A., 2005, New automated colorimetric method for measuring total oxidant status, *Clin Biochem*; 38: 1103-1111, p.
- Gate, L., Tew, K.D., 2001, Glutathione S-transferases as emerging targets, *Expert Opin. Ther. Targets*, 5(4), 477-489 .
- Gilman, A. Goodman, L.S. 1991, "Chemotherapy of Neoplastic Diseases", *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8th edition, Pergamon Press, U.S.A. 1240-1306
- Giray B., Gürboy A., Hıncal F., 1996, Kanser oluşumu, risk faktörleri ve korunma. *Sendrom*, MAY: 96-107
- Güleş Ö., Eren Ü., 2008, Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler .Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi (2) 73-78.
- Gültekin, M., 2018, Türkiye Kanser İstatistikleri, [http: // kanser.gov.tr](http://kanser.gov.tr). pdf erişim tarihi: 02.01.2018
- Gunes s., Ayhanci A., Sahinturk V., Altay D.U., Uyar R., 2016, Carvacrol attenuates cyclophosphamide-induced oxidative stress in rat Kidney, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*; p.1-30.
- Farber, E., 1982, Chemical Carcinogenesis, a Biologic Perspective. *Amer. J. Path.*;2: 271-296.
- Heath, J.R.; Davis, M.E., 2008, " Nanotechnology and cancer", *Annu. Rev. Med.*, 59, 251-265.
- Hertog M.G.L., Feskens E.J.M., Hollman P.C.H., Katan M.B., Kromhout D,1993, *Lancet*. , 342, 1007.
- Hışıl, Y., Şahin, F., Omay, S.B., 2005, Kantaronun Bileşimi ve Tıbbi Önemi, *Uluslararası Hematoloji-Onkoloji Dergisi*, Sayı, Cilt:15,212-218.
- İbadova, S., 2006, Bazı Hypericum Türlerinin Fenolik Bileşimi İle Antioksidan Ve Serbest Radikal Süpürücü Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- İşcan M., Çoban T., 1998, Normal ve neoplastik meme dokusunda antioksidan enzimler, Klinik Gelişim.; 11: s. 392–395.
- Kanno T.Y.N., Sensiate L.A., Paula N.A., Salles M.J.s., 2009, Toxic effects of different doses of cyclophosphamide on the reproductive parameters of male mice, BrazilianJournal of Pharmaceutical Sciences vol. 45, n. 2.
- Karaoğlan, M., 2014, Kırmızı Kantaron (*Hypericum capitatum* var. *Capitatum*)’un Farklı Bitki Kısımlarının Mineral Madde İçeriği Ve Uçucu Yağ Bileşenlerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Kara, K., 2015, Onkoloji Hastalarına Uygulanan Farklı Tıbbi Tedavi Yöntemlerinin Beslenme Durumu ve Kaygı Düzeyi Üzerine Etkisi. Başkent Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı (Yüksek Lisans Tezi).
- Karabulut, H., Gülay, M.Ş., 2016, Serbest Radikaller, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi, Derleme/Review 4(1):50.59.
- Kayaalp, S.O., 1989, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Feryal Matbaacılık, cilt:1, s. 973-993, Cilt: 2, s.1100-1107.
- Kayaalp, S.O., 1998, Kanser Kemoterapisinin Esasları ve Antineoplastik İlaçlar, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, cilt 1, 8.basım, Feryal Matbaacılık, Ankara, 1007-1072.
- Kayaalp, O., 2005, İmmün sistem bozuklukları ve immünomodülatör ilaçlar, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji 11.Baskı, Ankara, 344-353, s.
- Karabelyos, C., Dobozy, O., Szalai, C., Klenjanszki, K., Varju, K., Hadhazy, A., Kíss, A., Fulop, K. A., Madarasz, B., Falus, A., 1999, Elevated Hepatic Glucocorticoid Receptor Expression During Liver Regeneration in Rats, Cell- and Immunobiology Nagyvarad, 5, 107-9.
- Kawabata, T.T., Chapman, M.Y., Kim, D.H., Stevens, W.D. and Holsapple, M.P., 1990, Mechanism of in vitro Immunosuppression by Hepatocyte Generated Cyclophosphamide Metabolites and 4–Hydroxycyclophosphamide, Biochemical Pharmacology, Vol. 40: No. 5, pp. 927 – 935.
- Kim JC., Kim KH., Chung MK. 1999, Testicular cytotoxicity of DA-125, a new anthracycline anticancer agent, in rats. Rep rod To xi col;13(5):391-7.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Kim SH., Lee I., Baek HS., Moon C., Kim SH., Kim JC. 2013, Protective effect of diallyl disulfide on cyclophosphamide induced testicular toxicity in rats. *Lab Anim Res*29(4), 204-211.
- Kızılcı, S., 1999, Kemoterapi Alan Kanserli Hastalar ve Yakınlarının Yaşam Kalitesini Etkileyen Faktörler, C.Ü.Hemşirelik Yüksekokulu Dergisi, 3(2).
- Kutluk, T., Kars, A., 1992, Kanser Konusunda Genel Bilgiler T.C. Sağlık Bakanlığı Sağlık Projesi Genel Koordinatörlüğü, s.1-141.
- Ladas, E. J., Jacobson, J. S., Kennedy, D. D., Teel, K., Fleischauer, A., Kelly, K.M., 2004, Antioxidants and cancer therapy: a systematic review *Journal of Clinical Oncology*, 22(3), p.517-528.
- Limandal Ç., 2013, Siklofosfamid Kaynaklı Sıçan Gonadotoksitesinde E Vitamini'nin Olası Rolünün İmmünohistokimyasal Yöntemlerle Araştırılması. Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Manson, M.M., Gecher A., Hudson E.A. and et al.: 2000, Blocking and Suppressing Mechanisms of Chemoprevention by Dietary Constituents. *Toxicology Letters*. ; 112-113: 449-505.
- Masuda, H., Chancellor, M.B., Kihara, K., & Yoshimura, N. 2006, 15-deoxy Delta12,14- prostaglandin J2 attenuates development of cyclophosphamide induced cystitis in rats. *Urology*. 67:435.
- Memişoğlu, A.S., 2016, Kancersiz Bir Yaşam Tarzı Oluşturma Açısından Ortaöğretim (orta ve lise) Fen Derslerinin Katkısı, *International Journal Of New Trends In Arts,Sports&Science Education*, 5,4, s.1-12.
- Murray, C.J.L., Lopez, A.D, 1997, Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global burden of disease study. *Lancet*; 349:1498-504, p.
- Oh, K.; Baik, H., 2009, The reversal of drug-resistance in tumors using a drug-carrying nanoparticulate system, *Int. J. Mol. Sci.*, 10, 3776-3792.
- Ozturk B, Apaydin S, Goldeli E., 2002, *Hypericum triquetrifolium* Turra. Extract exhibits anti-inflammatory activity in the rat. *J Ethnopharmacol* 80: 207-209.
- Patocka J., The chemistry pharmacology and toxicology of the biologically active constituents of the herb *Hypericum perforatum* L. 1:61-70.
- Perry, M.C., 2008, Scientific basis of cancer chemotherapy. In: *The Chemotherapy Source Book*. 4nded. Ed.:M.C. Perry, Philadelphia; Lippincott Williams & Wilkins, p:1-7.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Pistelli L, Bertoli A, Morelli I. 2005, Chemical and antibacterial evaluation of *Hypericum triquetrifolium* Turra. *Phytother Res* 19: 787-791.
- Pizzo, PA., Paplack, DG., 2001, Principles and Practice of Pediatric Oncology. Lippincott: Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Potoğlu- Erkara, İ., ve Tokur, S., 2004, Morphological and Anatomical Investigations on Some *Hypericum* L. Species Growing Naturally in and Around Eskisehir, *Trakya Univ. J. Sci.*, 5(2), 97-105,.
- Ragheb AM, Sabanegh ES.,2010, Male fertility-implications of anticancer treatment and strategies to mitigate gonado-toxicity, *Anticancer Agents Med Chem*, 10:92-102.
- Ray, S., Pandit, B., Ray, S.D., Das, S., Chakraborty, S., 2010, Cyclophosphamide induced lipid peroxidation and changes in cholesterol content: protective role of reduced glutathione. 1. *Int J Pharm Tech Res.* 2:704-718.
- Reece J.B., Urry L.A., Michael C., Wasserman S.A., Minarsky P.V., Jackson R.B.,2013, *Campbell Biology* 9.Baskı, Palme Yayıncılık.
- Reiter WJ, Kratzik C, Brodowicz T, Haitel A, Pokorny A, Zielinski CC, Marberger M., 1998, Sperm analysis and serum follicle-stimulating hormone levels before and after adjuvant single-agent carboplatin therapy for clinical stage I seminoma. *Urology*;52:117-9.
- Ringer DP., Schnipper LE., 2001, Principles of Cancer Biology. İn: Lenhard RE, Osteen RT,Gansler T;eds. *Clinical Oncology* Atlanta: American Cancer Society;:21-35.
- Robson N.K.B, 1975. *Flora of Turkey and The East Aegean Islands*. Vol:2, Edit, P. H.Davis, University Press, Edinburgh.
- Robson N.K.B., 2006, Studies in the genus *Hypericum* L. (Clusiaceae). Section 9.*Hypericum sensu lato* (part 3): Subsection 1. *Hypericum* series 2. *Senanensia*, subsection 2.*Erecta* and section 9b.*Graveolentia*, *Systematics and Biodiversity*, 4:1, 19-98.
- Saad B, Azaizeh H, Said O, 2007, Arab botanical medicines. In: Watson R. and Preedy, V.(eds). *The Encyclopedia of Botanicals in Clinical Practice*.
- Saad B, Abouatta BS, Basha W, Hmade A, Kmail A, Khasib S, Said O. 2008, *Hypericum triquetrifolium* - Derived Factors Downregulate the Production Levels of LPS Induced Nitric Oxide and Tumor Necrosis Factor- in THP-1 Cells, *eCAM*.17
- Sabuncuoğlu, S.,Özgüneş, H., 2011, Kemoterapi, Serbest Radikaller Ve Oksidatif Stres, *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi* Cilt:31, Sayı:2 s.137-150.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Sakar, M.K., Tamer, A.U. and Tokur, S., 1988, Antimicrobial Activities of Some *Hypericum* Species Growing in Turkey, *Fitoterapia*, 59, 49-52.
- Sharlip ID., Jarow JP., Belker AM., Lipshultz LI., Sigman M., Thomas AJ., Schlegel PN., Howards SS., Nehra A., Dame- wood MD., Overstreet JW., Sadovsky R., 2002, Best practice policies for male infertility. *Fertil Sreril*77:873-82.
- Shinoda K, Mitsumori K, Yasuhara K, Uneyama C, Onodera H, Hirose M, et al. Doxorubicin induces male germ cell apoptosis in rats. *Arch To xi col* 1999;73(4 5):274-81
- Shokrzadeh M., Ahmadi A., Naghshvar F., Chabra A., and Jafarinajhad M., 2014, Prophylactic Efficacy of Melatonin on Cyclophosphamide- Induced Liver Toxicity in Mice. *BioMed Reseach İnternatinol*; 1: p.1-7.
- Smart E., Lopes F., Rice S., Nogy B., Anderson R.A., Mitchell R.T., Spears N., 2018, Chemotherapy drugs cyclophosphamide, cisplatin and doxorubicin induce germ cell loss in an invitro model of the prepubertal testis. *Scientific Reports*; 8:p. 19761-9.
- Tara S. Barton, Andrew J. Wyrobek v.d., 2003, Numerical Chromosomal Abnormalities in Rat Epididymal Spermatozoa Following Chronic Cyclophosphamide Exposure; *Biology of Reproduction* October 1 vol. 69no. 4 1150-1157.
- Todorova V., Vanderpool D., Blossom S., Nwokedi E., Hennings L., Mrak R., 2009, Oral glutamine protects against cyclophosphamide-induced cardiotoxicity in experimental rats through increase of cardiac glutathione, *Nutrition* ;25:p.812-7.
- Toker, Z. 2002. Bazı *Hypericum* Türlerinin Uçucu Yağ Bileşenleri ve Bu Yağların Antimikrobiyal Aktiviteleri. Doktora Tezi, Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.
- Toker Z., 2009.Variation of total hypericin, phenolic and fl avonoid compounds in *Hypericum triquetrifolium* during its phenological cycle. *Pharm Biol* 47: 285 288.
- Türk G., 2013, Kemoterapötiklerin Erkek Üreme Sistemi Üzerindeki Yan Etkileri Ve Koruyucu Stratejiler, *Marmara Pharmaceutical Journal* 17:73-92.
- Türk P., 2016, Siklofosfamide Bağlı Ovaryan Toksisiteyi Azaltmada Silmarinin Rolü, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları Ve Doğum Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi (Danışman: Doç. Dr. Kemal ÖZERKAN).
- Türker, F.A., Kayaalp, S.O., 2002, Kanser kemoterapisinin esasları ve antineoplastik ilaçlar, Kayaalp, S.O. (Eds), *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*, Ankara, Feryal Matbaacılık, s. 380-415.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Turc, J.L., Poulter, L.W., 1972, Selective depletion of Lymphoid Tissue by Cyclophosphamide, Clin. Exp. Immunol, 10 s. 285-296.,
- Türkiye Kanser Araştırmaları. 2013-2018 T.C. Sağlık Bakanlığı. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu.http://www.iccpportal.org/sites/default/files/plans/Ulusal_Kanser_Kontrol_Plani_2013_2018.pdf 8.3.2016.
- Urlu, E., 2014, Hypericum capitatum var. Capitatum ve Hypericum Perforatum'un farklı bitki kısımlarının toplam fenol içeriği, toplam indirgenme kuvveti tayini ve antioksidan özelliklerinin belirlenmesi, Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.
- Üstündağ S. 2013, Kemoterapi alan kanser hastalarının semptom yönetiminde ulandıkları tamamlayıcı tedavi yaklaşımlarının yaşam kalitesine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Vardı, N., Parlakpınar, H., Ateş, B., Otlu, A., 2010, Metotraksatın Neden Olduğu Testiküler Hasara Karşı Klorojenik Asidin Koruyucu Etkileri, Türkiye Klinikleri, 30(2):507-13.
- Yağcı, E., Güneş, H.V., 2017, Notch Sinyal Yolağı ve Karsinogenez, Osmangazi Tıp Dergisi, 39, s.109-116.
- Yagi K 1984: Assay for blood plasma or serum, Methods Enzymol 105: 328-331.
- Yang GS, Wang W, Wang YM, Chen ZD, Wang S, Fang JJ, 2006;. Effect of cocaine on germ cell apoptosis in rats at different ages. Asi an J Androl 8(5):569-75.
- Yuspa S.H., Poirier M.C. 1988, Chemical Carcinogenesis: from Animal Models to Molecular Models in One Decade. Adv. Cancer Res.; 50: 25-70.
- Wei XJ, Hu TJ, Chen JR, Wei YY. 2011, Inhibitory effect of carboxymethylpachymaran on cyclophosphamide-induced oxidative stress in mice. Int J Biol Macromol; 49: 801-805.
- Willcox JK, Ash SL, Catignani GL. 2004, Antioxidants and prevention of chronic disease. Crit Rev Food Sci Nutr. 44: 275-295.
- Williams D, Crofton PM, Levitt G. 2008, Does ifosfamide affect gonadal function? Pediatr Blood Cancer;50:347-51.
- Zhang, R., Wu, C., Wang, X., Sun, Q., Chen, B., Li, X., Gutmann, S., Lv, G. 2009, "Enhancement effect of nano Fe₃O₄ to the drug accumulation of doxorubicin in cancer cells", *Materials Science and Engineering*, C 29, 1697-1701.

EK AÇIKLAMALAR

Ek Açıklama-A :Etik Kurul Kararı (HADYEK)

71



T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(HADYEK)

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 28. 07. 2016
TOPLANTI SAYISI	: 98
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 531-1
KARAR NUMARASI	: 531-1
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Prof. Dr. Adnan AYHANCI
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	: Doktora Öğr. Senanur CAN Doktora Öğr. Özgün TEKSOY Öğr. Gör. Dr. Songül ÇETİK Yrd. Doç. Dr. Cumali KESKİN
HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: Wistar albino (63 adet erkek)

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji/Genel Biyoloji Bölümü Öğretim üyesi Prof. Dr. Adnan AYHANCI'nın araştırma yürütücüsü olduğu 531-1/2016 kayıt numaralı ve "Hipericum triquetrifolium turra Bitkisinin Sıçanlarda Kemoterapi Nedenli Testiküler Toksikiteye Karşı Koruyucu Etkisi" konulu çalışma; Deney Hayvanları Etik Kurulu Yönergesi'ne göre değerlendirilmiş ve gerekçede belirtildiği şekilde yapılması uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Kevsir EROL (Başkan)

Prof. Dr. Kubilay UZUNER (Üye)

Prof. Dr. Hasan V. GÜNEŞ (Üye)

Prof. Dr. Emel ULUPINAR. (Üye)

Doç. Dr. Ergün YILDIRIM (Üye)

Yrd. Doç. Dr. İnal ÖZELMAS (Üye)

Yrd. Doç. Dr. Nurlan KIRIMLIOĞLU (Üye)

Yrd. Doç. Dr. Vet. Hek. Oya ERALP İNAN (Üye)

Vet. Hek. Refik ARTAN (Üye)

Avukat Şükrü KIRDEMİR (Üye)



T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(HADYEK)

GEREKÇE

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji/Genel Biyoloji Bölümü Öğretim üyesi **Prof. Dr. Adnan AYHANCI**'nin araştırma yürütücüsü olduğu 531-1/2016 kayıt numaralı ve “**Hipericum triquetrifolium turra Bitkisinin Sıçanlarda Kemoterapi Nedenli Testiküler Toksisiteye Karşı Koruyucu Etkisi**” konulu çalışma; tarafımızdan değerlendirilmiştir.

Deneyel çalışmada sağlıklı, erkek, 200 ± 20 gram ağırlıkta, yaklaşık 3 aylık, Wistar 63 adet cinsi albino sıçanlar kullanılacaktır. Tüm deney hayvanları T.C. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezi (TİCAM)'nden temin edilerek deney süresince 12;12 aydınlık/karanlık ışıklandırması olan, ısı (22 ± 2 C°) ve nemi (%45-50) otomatik olarak ayarlanmış odalarda yaşatılacaktır. Deneye başlanmadan önce hayvanların bir hafta süre ile ortam koşullarına adaptasyonu sağlanacaktır. Bu adaptasyon sürecinde tüm sıçanlar polikarbon kafeslerde standart sıçan yemi ile beslenecek ve çeşme suyu verilecektir.

Deney Grupları

Deney hayvanları arasından rastgele seçimle her birinde $n=7$ 'şer sıçan olmak üzere toplam 9 grup oluşturulacaktır. Bunlar;

Grup 1: (Kontrol): Sıçanlara 6 gün boyunca 0.5 mL Serum Fizyolojik (SF) enjeksiyonu yapılacaktır. 7. gün tüm hayvanlar sakrifiye edilecektir.

Grup 2: Sıçanlara 5 gün boyunca 0.5 mL Serum Fizyolojik (SF) enjeksiyonu yapılacak ve deneyin.6. gününde tek doz **150 mg/kg CP+0.5 mL SF** enjeksiyonu yapılacaktır. 7. gün tüm hayvanlar sakrifiye edilecektir.

Grup 3: Sıçanlara 6 gün boyunca **25 µg/ml HT ekstre + 0.5 mL SF** enjeksiyonu yapılacaktır. 7. gün tüm hayvanlar sakrifiye edilecektir.

Grup 4: Sıçanlara 6 gün boyunca **50 µg/ml HT ekstre + 0.5 mL SF** enjeksiyonu yapılacaktır. 7. gün tüm hayvanlar sakrifiye edilecektir.

Grup 5: Sıçanlara 6 gün boyunca **100 µg/ml HT ekstre + 0.5 mL SF** enjeksiyonu yapılacaktır. 7. gün tüm hayvanlar sakrifiye edilecektir.

Grup 6: Sıçanlara 5 gün boyunca 0.5 mL Serum Fizyolojik (SF) enjeksiyonu yapılacak ve deneyin.6. gününde **150 mg/kg CP + 25 µg/ml HT ekstre** enjeksiyonu yapılacaktır. 7. gün tüm hayvanlar sakrifiye edilecektir.

Grup 7: Sıçanlara 5 gün boyunca 0.5 mL Serum Fizyolojik (SF) enjeksiyonu yapılacak ve deneyin.6. gününde **150 mg/kg CP + 50 µg/ml HT ekstre** enjeksiyonu yapılacaktır. 7. gün tüm hayvanlar sakrifiye edilecektir.



T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(HADYEK)

Grup 8: Sıçanlara 5 gün boyunca 0.5 mL Serum Fizyolojik (SF) enjeksiyonu yapılacak ve deneyin.6. gününde **150 mg/kg CP+100 µg/ml HT** ekstre enjeksiyonu yapılacaktır. 7. gün tüm hayvanlar sakrifiye edilecektir.

Grup 9: Sıçanlara 6 gün boyunca **0,5 mL % 0,2 DMSO** grubu enjeksiyonu yapılacaktır. 7. gün tüm hayvanlar sakrifiye edilecektir.

Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması

Bitki örnekleri Mayıs-Eylül dönemlerinde alınıp küçük parçalara ayrıldıktan sonra öğütücü yardımıyla toz haline gelinceye kadar öğütülecektir. Öğütülmüş bitki kısımlarından 50g alınıp metanolden oluşan çözücü serilerinde oda sıcaklığında, içinde 100 ml çözücü olacak şekilde çalkalayıcı su banyosunda bekletilecek, 24 saat aralıklarla işlem 3 kez tekrarlanarak çözünmeyen kısımlar filtre edilip süzütünün çözücüsü vakum altında evapore edilecektir. Tamamen çözücüsünden uzaklaştırmak amacıyla liyofilize edilen ham özüt, hemen ardından 0,5 mL %0,2 DMSO (Dimetilsülfoksit) içerisinde çözülerek deneklere uygulanacaktır. Elde edilen HT metanol özütleri daha sonra değişik aşamalarda ihtiyaç halinde kullanılmak üzere derin dondurucuda (-20) muhafaza edilecektir.

Kimyasal madde ve enjeksiyonlar

Siklofosamid (CP) (Sigma-Aldrich) ticari olarak temin edilecektir. CP'in 500 mg'ı 25 ml bidistile suda çözülerek enjeksiyona hazır duruma getirilecek ve enjeksiyon steril tek kullanımlık enjektörlerle yapılacaktır. Kimyasal madde enjeksiyonları, çözeltilerin taze olarak hazırlanmasından sonra yapılacaktır. Bütün hayvanlar ilk enjeksiyondan ve öldürülmeden önce tartılarak ağırlıkları saptanacak ve böylece uygulanacak ilaç dozları belirlenecektir. Tüm enjeksiyonlar intraperitoneal (i.p.) olarak yapılacaktır. Kontrol grubundaki sıçanlara 0,5 mL serum fizyolojik (SF) verilecektir. CP (150 mg/kg) ile birlikte HT ekstraktı verilen gruplarda ise HT ekstraktının verilmesine CP uygulamasından 5 gün önce başlanacak ve deney süresince devam edilecektir. 6. gün sıçanlar tekrar tartılacak, CP dozları hesaplanacak ve sıçanlara CP verilecektir. HT metanol özütü %0,2 10 ml DMSO içerisinde çözdürülerek verilecektir. 7. gün tüm sıçanlardan ketamin/ksilazin anestezi ile biyokimyasal analizler için intrakardiyak kan alımı yapılacaktır.

9.Grup ve 1. Grup arasında ne fark olduğu belirtilmelidir. DMSO ne için gereklidir? O zaman tüm gruplara DMSO verilmelidir. Bitkinin hangi kısmının kullanılacağı belirtilmelidir. Bitki örneklerinin Mayıs-Eylül dönemlerinde nerden alınacağı belirtilmelidir.

Kullanılan yöntemler uluslararası standardı olan yöntemlerdir. Gerekli literatürler verilmiştir. Çalışmanın yapılmasında, Komisyonumuzun olumsuz görüşü bulunmamaktadır.

ÖZGEÇMİŞ

- 1. Adı Soyadı** : Senanur CAN
- Mail** : senanurc@hotmail.com
- 2. Doğum Tarihi** : 01.01.1990 Eskişehir
- 3. Unvanı** : Moleküler Biyolog

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji/Kimya	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi	2007-2011
Yüksek Lisans	Moleküler Biyoloji	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi	2012-2014
Doktora	Genel Biyoloji	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi	2015-2018

4. İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl)
1. Öğretmen	Özel Yesevi Eğitim Kurumları	2014-2018
2. Müdür Yardımcısı	Özel Yesevi Eğitim Kurumları	2015-2018

Yüksek Lisans Tezi

Sıçanlarda Uzun Süreli Böbrek İskemi / Reperfüzyon Hasarına Karşı Geraniol'ün Koruyucu Etkisi (2014) (Tez Danışmanı: Prof.Dr.Mediha CANBEK)

Doktora Tezi

Hipericum triquetrifolium Turra bitki ekstresinin sıçanlarda kemoterapi nedenli testiküler hasara karşı koruyucu etkisi (2018) (Tez Danışmanı: Prof.Dr.Adnan AYHANCI)